

**Charakterisierung des Myb-Transkriptionsfaktors p42POP:
Eine Verbindung des Mikrofilamentsystems zur Transkription**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Marcell Ivo Lederer
aus Kempten

1. Referentin: Prof. Dr. B.M. Jockusch

2. Referent: Prof. Dr. H.-H. Arnold

eingereicht am: 16.09.2002

mündliche Prüfung (Disputation) am: 17.12.2002

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Naturwissenschaftlichen Fakultät in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge:

Rothkegel M., Marquardt K., Lederer M., Jockusch B.M. (1998): POP, a novel proline-rich ligand for profilin: Identification and molecular characterisation. Europ J. Cell Biol Supplement 48, Vol. 75, p. 64 (Nr. 171)

Lederer M., Marquardt K., Jockusch B.M., Rothkegel M. (2001): Functional characterisation of p42POP, a novel Myb protein and ligand for profilins. CNRS-Jacque Monod/EMBO Conference: Microfilament Function and Regulation in Cell Polarity. 15.-19. September 2001, Presqu'île de Giens, France

Lederer M., Marquardt K., Jockusch B.M., Rothkegel M. (2002): Functional characterisation of p42POP, a novel Myb protein and ligand for profilins. International symposium of the SFB523 on Structure of the nucleus and Trafficking of RNPs in the Cell. 31. Januar-2. Februar 2002, Göttingen

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen	IV
Zusammenfassung.....	VI
I Einleitung.....	1
1 Profilin – Gewebsspezifische Expression verschiedener Isoformen.....	2
1.1 Strukturelle Lokalisation verschiedener Ligandenbindungsmotive	3
1.2 Wechselwirkung mit Aktin und Einfluß von Profilin auf das Mikrofilamentsystem	4
1.3 Profilin als Mittler zwischen Mikrofilamentsystem und Signaltransduktion.....	6
1.4 Interaktion mit poly-L-Prolin Liganden	7
2 Transkriptionsfaktoren der Myb-Familie	9
2.1 Struktureller Aufbau der DNA-Bindungsdomäne.....	11
2.2 Regulation der c-Myb-vermittelten Aktivierung durch posttranslationale Modifikationen und Ligandenwechselwirkungen	12
2.3 Zelluläre Zielgene von c-Myb	16
3 Aufgabenstellung.....	17
II Material und Methoden	18
1 Material	18
1.1 Chemikalien und Enzyme	18
1.2 Bakterien	18
1.3 Hefen	19
1.4 Tierische Zellkulturzellen.....	20
1.5 Vektoren	20
1.6 Oligodesoxynukleotide.....	21
1.7 Antikörper	23
1.8 Geräte	24
2 Methoden.....	25
2.1 Molekularbiologische Methoden.....	25
2.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien	25
2.1.2 Transformation von Bakterien	25
2.1.3 RNA-Präparation	26
2.1.4 Plasmidpräparation.....	26
2.1.4.1 TELT-Methode.....	26
2.1.4.2 Alkalische Lyse	26
2.1.4.3 Plasmidpräparation mit <i>Qiagen Plasmid Kits</i>	27
2.1.5 Spektrophometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	27
2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	27
2.1.6.1 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese	27
2.1.6.2 DNA-Gelelektrophorese.....	28
2.1.7 Herstellung eines DNA-Längenmarkers	28
2.1.8 DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen.....	29
2.1.9 Phenol-Extraktion	29

2.1.10 Alkohol-Präzipitation von DNA	29
2.1.11 Polyethylenglycol (PEG)-Präzipitation	30
2.1.12 DNA-Fragment-Isolierung	30
2.1.13 Dephosphorylierung von 5'-Phosphatenden	30
2.1.14 <i>In vitro</i> -Neukombination von DNA-Fragmenten	31
2.1.15 Reverse Transkription	31
2.1.16 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	31
2.1.17 Klonierung von PCR-Produkten	32
2.1.17.1 pGEM®-T-Easy Vektor	32
2.1.17.2 Zero Blunt™ PCR Cloning Kit	32
2.1.18 Ortsspezifische Mutagenese	33
2.1.19 Southern Blot	33
2.1.20 Nichtradioaktive Markierung von DNA	33
2.1.21 Hybridisierung und Nachweis Dig-11dUTP-markierter Sonden	34
2.1.22 Radioaktive Markierung doppelsträngiger Oligodesoxynukleotide	34
2.1.23 Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung	34
2.2 Biochemische Methoden	35
2.2.1 Expression in <i>E. coli</i> und Zellschnellaufschluß	35
2.2.2 Expression und Reinigung von rekombinantem Maus Profilin I und IIa	35
2.2.2.1 Herstellung von poly-L-Prolin-Sepharose	35
2.2.2.2 Expression und Reinigung	36
2.2.3 Expression und Reinigung von rekombinanten p42POP-Fragmenten mit His-Tag	36
2.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration	37
2.2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford	37
2.2.4.2 Proteinbestimmung über molare Extinktionskoeffizienten	37
2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.2.6 Immunblot	39
2.2.7 Phosphorylierung von Profilin durch die Proteinkinase C α (PKC α)	39
2.2.8 Phosphorylierung mittels der cAMP-abhängigen Serin/Threonin Proteinkinase (PKA)	40
2.2.9 <i>Chemical crosslinks</i> mit NHS/EDC	40
2.2.10 <i>Yeast two-hybrid</i> System	41
2.2.11 <i>In vitro</i> Transkription und Translation zur radioaktiven Markierung von Polypeptiden	41
2.2.12 <i>Dot overlay</i> Assay	42
2.2.13 <i>Electrophoretic mobility shift assay</i> (EMSA)	42
2.2.14 Präzipitation mittels poly-L-Prolin Sepharose	43
2.2.15 Bindungsstudien durch indirekte <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> (ELISA)	43
2.3 Zellbiologische Methoden	44
2.3.1 Kultivierung von Zellkulturzellen	44
2.3.2 Passagieren von Zellen	44
2.3.3 Kryokonservierung von Zellen	45
2.3.4 Transiente Transfektion von Zellen	45
2.3.4.1 Calciumphosphat-Methode	45
2.3.4.2 Transfektion mit FuGene™ Transfektionsreagenz	45
2.3.5 Fixierung und Permeabilisierung von Zellen	46
2.3.6 β -Galaktosidase Assay zur Bestimmung der Transfektionseffizienz einer transienten Transfektion	46
2.3.7 Luciferase-Assay	47
2.3.8 Heterokaryon Assay	47
2.3.9 Coimmunpräzipitation	48

III Ergebnisse.....	49
1 p42POP zeigt Motiv-Homologien zu verschiedenen Proteinsequenzen.....	49
2 Genstruktur und Genlocus von p42POP	52
3 p42POP wird in Mausgeweben ubiquitär exprimiert.....	53
4 Konstruktion verschiedener p42POP-Fragmente auf Basis von Sequenzmotiven und Genstruktur.....	54
5 Die Myb-Domäne in p42POP ist funktionell.....	55
6 Die transkriptionelle Aktivität wird durch die saure Region von p42POP vermittelt.....	58
7 p42POP dimerisiert über ein Leuzin-Zipper Motiv in der C-terminalen Region.....	60
8 Negative Regulation der transkriptionellen Aktivierung von p42POP durch den Leuzin-Zipper	63
9 Phosphorylierung als potentieller Regulationsmechanismus der Dimerisierung.....	64
10 Die Kernimport- und Kernexportsignale in p42POP sind funktionell.....	66
11 p42POP interagiert mit monomerem Aktin.....	69
12 Prolinreiche Motive in p42POP vermittelt die Interaktion mit Profilin-Isoformen	72
13 Der Leuzin-Zipper beeinflußt im <i>Yeast two-hybrid</i> System die Interaktion zwischen p42POP und den Profilin-Isoformen nicht.....	75
14 Einfluß der potentiellen PKC-Phosphorylierungsstelle Threonin T273 auf die Interaktion von p42POP und Profilin	76
15 Regulation der Ligandenwechselwirkung und zellulären Funktion von Profilin durch Phosphorylierung	78
16 Maus Profilin Ila ist ein Substrat der Proteinkinase $C\alpha$ (PKC α).....	79
17 Die Interaktion zwischen Maus Profilin I bzw. Ila mit PKC α wird durch Lipide moduliert	81
18 PKA-Phosphorylierung von Profilin I und Ila	82
19 Simulation der Phosphorylierung von Serin138 in Profilin I bzw. Ila inhibiert die Interaktion mit poly-L-Prolin und prolinreichen Liganden.....	83
20 <i>In vitro</i> phosphoryliertes Profilin I und Ila unterscheiden sich in ihrer poly-L-Prolin Bindung	86
21 <i>In vitro</i> Phosphorylierung von Profilin I und Ila durch PKA inhibiert die Interaktion mit Aktin.....	87
IV Diskussion	89
1 Identifizierung von p42POP als funktioneller Transkriptionsfaktor der Myb-Familie.....	90
2 Wechselwirkung von p42POP mit den cytoskelettalen Proteinen Profilin und G-Aktin..	93
3 Cytoskelettale Proteine und Transkription	96
4 Einfluß der Profilin-Phosphorylierung auf die Ligandenwechselwirkung	98
5 Ausblick	103
V Literaturverzeichnis.....	105

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
Acc. #	„ <i>Genbank accession number</i> “
ATCC	“ <i>American Type Culture Collection</i> ”
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	engl. Basenpaare
BSA	engl. Rinderserumalbumin
Blot	<i>Western-Blot</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C-Terminus	Carboxy-Terminus
cDNA	<i>copy</i> -Desoxyribonukleinsäure
CMF-PBS	Calcium-Magnesium-freie Phosphat-gepufferte Saline
DEAE	Diethylaminoethyl-
DMEM	“ <i>Dulbecco’s Modified Eagle Medium</i> ”
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor
ds	doppelsträngig
DSP	Dithiobis(succinimidyl propionate)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	“ <i>enzyme linked immunosorbend assay</i> ”
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethyl-Aminopropyl)-Carbodiimid
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	engl. fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
G-Aktin	globuläres Aktin
HMW	„ <i>high molecular weight marker</i> “
HRP	engl. Meerrettich-Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kB	Kilobase
kDa	Kilodalton
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LB	Luria Broth
LMW	“ <i>low molecular weight marker</i> ”
M, mM, µM, nM	molar, millimolar, mikromolar, nanomolar

mA	Milliampere
mol, mmol, μ mol, nmol, pmol	Mol, Millimol, Mikromol, Nanomol, Pikomol
mRNA	“ <i>messenger</i> ”-Ribonukleinsäure
MW	engl. Molekulargewicht
NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
Ni	Nickel
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
ONPG	O-nitrophenyl- β -D-galactoside
PCR	engl. Polymerase-Kettenreaktion
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	engl. Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	engl. Natrium-Dodecylsulfat
sog.	sogenannt
ss	einzelsträngig
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-Zusatz
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TRITC	Tetramethyl-Rhodaminisothiocyanat
U	engl. Enzymeinheiten
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

ZUSAMMENFASSUNG

Die Funktion Mikrofilament-assoziiierter Proteine wird in morphologischen Prozessen und der Generierung einer funktionellen und strukturellen Zellpolarität gesehen. Verschiedene Hinweise legen zudem Aufgaben von Aktin und dem G-Aktin-bindenden Protein Profilin im Zellkern nahe und bringen beide Proteine in Zusammenhang mit transkriptionellen Ereignissen.

Mit p42POP wurde ein neuer prolinreicher Ligand für Profilin und G-Aktin identifiziert, der Homologie zur DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors c-Myb aufweist und entsprechend eine Rolle bei Mikrofilament-vermittelten, regulatorischen Einflüssen auf die Transkription spezifischer Zielgene spielen könnte. Durch den Nachweis der spezifischen Interaktion mit einem Konsensus-DNA-Motiv der Myb-Transkriptionsfaktoren und der Charakterisierung der DNA-Bindungsdomäne konnte p42POP als erstes Protein der Myb-Familie in Vertebraten mit einem einzigen funktionellen Myb-*repeat* identifiziert werden. Eine transkriptionsaktivierende Wirkung wurde einem sauren Bereich zugewiesen, dessen Funktion durch negativ regulierende, C-terminal lokalisierte Bereiche von p42POP beeinflusst wird. Ein möglicher Regulationsmechanismus stellt in diesem Zusammenhang die durch ein Leuzin-Zipper Motiv vermittelte Dimerisierung von p42POP dar. Mutationen innerhalb dieses Motivs induzieren im Vergleich zum Wildtyp-Protein eine stärkere transkriptionelle Aktivierung.

Die Lokalisation der Bindungsstellen für Profilin und Aktin geben Hinweis auf regulatorische Funktionen dieser Interaktionen bei der p42POP-vermittelten Genaktivierung: Das Thymosin β 4-ähnliche Bindungsmotiv für Aktin überlappt mit der Myb-Domäne und könnte entsprechend die Interaktion mit DNA modulieren. Prolinreiche Sequenzen, die den Leuzin-Zipper flankieren, vermitteln die Wechselwirkung mit Profilin, wodurch möglicherweise die Dimerisierung von p42POP beeinflusst wird. Eine Regulation dieser Wechselwirkung konnte zum einen mittels Mutationsanalysen auf die potentielle Phosphorylierungsstelle Threonin 273 in p42POP, zum anderen auf eine PKC-vermittelte Phosphorylierung von Profilin I an Serin 138 zurückgeführt werden. Diese Modifikation stellt einen generellen Regulationsmechanismus für die Interaktion zwischen Profilin I und prolinreichen Liganden dar.

Die dargestellten Ergebnisse stellen eine Verbindung zwischen den cytoplasmatisch und nukleär lokalisierten Proteinen p42POP, Profilin und Aktin her und erweitern den Kenntnisstand über die Funktion cytoskelettaler Proteine im Zellkern.

I EINLEITUNG

Das Cytoskelett, ein komplexes Netzwerk verschiedenartiger Proteinfilamentsysteme, vermittelt eukaryotischen Zellen die Fähigkeit, unterschiedliche Gestalt anzunehmen und koordinierte und zielgerichtete Bewegungen durchzuführen. Gleichzeitig ist es an einer Vielzahl komplexer Vorgänge, wie Muskelkontraktion, Zelladhäsion, Zellteilung und Zelldifferenzierung beteiligt.

Diese morphologischen Funktionen und die Generierung einer funktionellen und strukturellen Zellpolarität wird durch das Zusammenspiel der unterschiedlichen Filamentsysteme (Mikrofilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente) mit zahlreichen assoziierten und regulatorischen Proteinen ermöglicht und durch externe oder interne Stimuli moduliert. Bedingung für derart komplexe Vorgänge ist unter anderem eine zeitliche und lokale Expression entsprechender Proteine, die beispielsweise durch spezifisch regulierte Transkription, lokale Translation infolge gezielter mRNA-Lokalisierung oder unterschiedliche Isoformen erfolgen kann. So konnte für Aktin, dem monomeren Baustein des Mikrofilamentsystems, eine gewebs- und zelltypspezifische Expression verschiedener Isoformen (Herman, 1993), sowie eine unterschiedliche Lokalisation der entsprechenden mRNAs innerhalb der Zelle (Hill et al., 1994; Lawrence and Singer, 1986; Sundell and Singer, 1991; Wilhelm and Vale, 1993) gezeigt werden.

Neben seiner überwiegend cytoplasmatischen Funktion lokalisiert Aktin zudem im Zellkern (Clark and Rosenbaum, 1979; Gonsior et al., 1999; Jockusch et al., 1974; Nakayasu and Ueda, 1983) und nimmt, vermittelt durch direkte Interaktion mit der RNA-Polymerase II (Smith et al., 1979; Weaver, 1976), regulatorischen Einfluß auf transkriptionelle Prozesse. Die Aktin-Synthese scheint, abhängig von der Konzentration des freien, polymerisierbaren G-Aktins, autoregulatorisch kontrolliert zu sein (Bershadsky et al., 1995). Auch bei der Aktivierung von Zielgenen des MADS-Box Transkriptionsfaktors SRF (*serum response*

factor), zu denen auch Aktin und Vinkulin gehören, spielt die Aktindynamik eine entscheidende Rolle (Sotiropoulos et al., 1999). Unabhängig vom Einfluß der Aktindynamik auf transkriptionelle Ereignisse werden auch Isoform-spezifische Effekte beschrieben. Skelettmuskel α -Aktin induziert beispielsweise die Expression verschiedener muskelspezifischer Gene (Gunning et al., 2001). In anderem Zusammenhang - bei der Genexpression des human pathogenen *Respiratory Syncytial Virus* (RSV) - aktiviert Aktin die virale Transkription und ist dafür unabdingbar (Burke et al., 1998; Huang et al., 1993; Mazumder and Barik, 1994).

Die dynamische Struktur des Mikrofilamentsystems, wie auch dessen statische Funktion, basiert auf dem Zusammenwirken struktureller und regulatorischer Proteine. Bei den bereits erwähnten Prozessen ist eine strikte lokale und zeitliche Kontrolle der Aktinpolymerisation von grundlegender Bedeutung für die Zelle. Ein mögliches Bindeglied zwischen Signaltransduktion und Aktindynamik stellt das G-Aktin-bindende Protein Profilin dar, das durch seine Wechselwirkung mit sauren Phospholipiden und verschiedenen regulatorischen Proteinen unmittelbar in diese Prozesse involviert ist.

1 Profilin – Gewebsspezifische Expression verschiedener Isoformen

Profilin, ein 12-16kDa großes, ubiquitär exprimiertes Protein, wurde als G-Aktin bindendes Protein identifiziert, dessen ursprüngliche Funktion in der Inhibierung der Aktinpolymerisation gesehen wurde (Carlsson et al., 1976). Mittlerweile konnte Profilin in allen untersuchten Eukaryoten - Protozoen, Echinodermata, Insekten, Pflanzen und Mammalia - und sogar in Vaccina Viren nachgewiesen werden (Blasco et al., 1991; Haarer et al., 1990; Machesky and Pollard, 1993; Sohn and Goldschmidt-Clermont, 1994; Sun et al., 1995). Zudem konnten in verschiedenen Spezies unterschiedliche Isoformen und Spleißvarianten identifiziert werden, die zum Teil unterschiedliche funktionelle und biochemische Eigenschaften aufweisen. In Säugern wurden bisher drei Isoformen identifiziert und charakterisiert (Di Nardo et al., 2000; Honore et al., 1993; Kwiatkowski et al., 1990; Kwiatkowski and Bruns, 1988; Lambrechts et al., 2000; Lambrechts et al., 1995), die sich in ihrer gewebsspezifischen Expression unterscheiden. Während Profilin I in fast allen untersuchten Geweben auf hohem Niveau – mit Ausnahme von Gehirn, Skelettmuskel und Herz – exprimiert wird, konnten die beiden alternativen Spleißvarianten des Profilin II-Gens (Di Nardo et al., 2000; Lambrechts et al., 2000), Profilin IIa und IIb, vorwiegend in

neuronaalem Gewebe, aber auch in Skelettmuskel nachgewiesen werden. In der Zwischenzeit wurde das Gen einer dritten Profilin-Isoform identifiziert, dessen mRNA ausschließlich in Hoden nachgewiesen werden konnte (Braun et al., 2002; Hu et al., 2001). Die Profilin-Isoformen weisen neben ihrer unterschiedlichen Gewebsverteilung verschiedene Affinitäten für gleiche Liganden (siehe Schluter et al., 1997) und unterschiedliche Liganden-Spezifität (Witke et al., 1998) auf.

Profilin, dessen exakte Funktion in der Zelle bisher nicht geklärt ist, stellt ein essentielles Protein während Differenzierungs- und Proliferationsprozessen dar. Profilin-defiziente einzellige Organismen zeigen Einschränkungen in Zellmotilität und Wachstum. Ausschaltung des *chickadee*-Gens, das in *Drosophila* für Profilin kodiert, oder des Profilin I-Gens in Mäusen verursacht starke Einschränkungen während der frühen Embryogenese (Verheyen and Cooley, 1994; Witke et al., 2001) und wirkt letal. Homozygote Profilin I-Mutanten sterben bereits vor dem Erreichen des Blastozystenstadiums und weisen auf essentielle Funktionen von Profilin I während der Proliferation und Zellteilung hin. Zudem zeigt bereits eine Reduktion des Expressionslevels von Profilin dramatische Einflüsse auf die Zelldifferenzierung. Die tumorigenen Eigenschaften und Veränderungen der Organisation des Mikrofilamentsystems, der Zellanheftung und des Zellwachstums einer humanen Brustkrebszelllinie konnten auf den niedrigen Profilin-Gehalt zurückgeführt und durch Profilin-Überexpression supprimiert werden (Janke et al., 2000).

1.1 Strukturelle Lokalisation verschiedener Ligandenbindungsmotive

Trotz teilweiser geringer Sequenzhomologie, die zwischen unterschiedlichen Spezies unter 20% liegt (Schluter et al., 1997), ist die Struktur der Profiline hochkonserviert. Eine kompakte Faltung exponiert Bindungsmotive für G-Aktin bzw. Aktin-ähnliche Proteine, saure Phospholipide und poly-L-Prolin-Liganden und bedingt dadurch die charakteristischen Eigenschaften und funktionelle Homologie der Profiline (Abb. 1). Ausnahmen stellen dabei das Vaccinia Virus Profilin mit seiner geringen Affinität zu poly-L-Prolin (Machesky et al., 1994) und die Säuger Spleißvariante Profilin IIb dar, für das weder eine Interaktion mit poly-L-Prolin noch G-Aktin gezeigt werden konnte, das jedoch Tubulin bindet und somit keine der charakteristischen Eigenschaften der Profiline aufweist (Di Nardo et al., 2000).

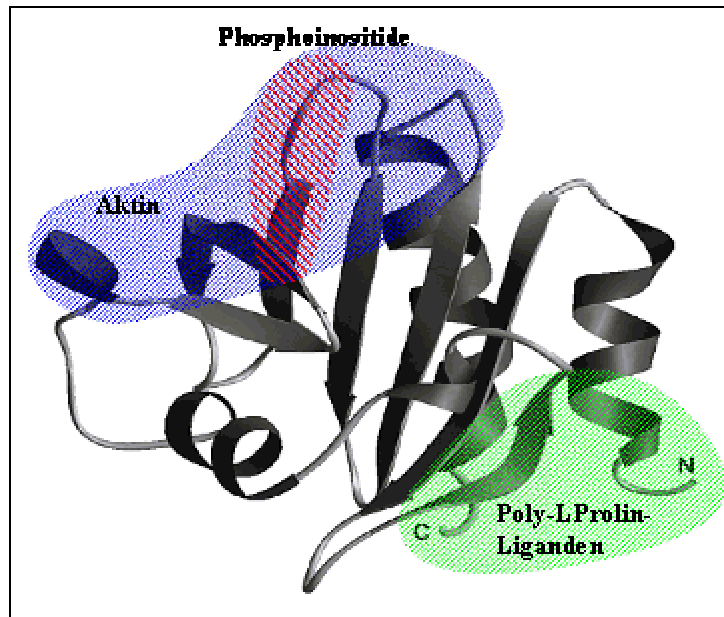


Abb. 1: Strukturmodell von Rinderprofilin I (nach Schutt et al., 1993) mit den Bindungsdomänen für Aktin (blau), Phosphoinositide (rot) und poly-L-Prolin-Motive (grün). (Schluter et al., 1997)

Aus dem dargestellten Strukturmodell wird ersichtlich, dass sich die Bindungsregionen von Aktin und sauren Phospholipiden überlappen. Tatsächlich schließt sich die Bindung beider Liganden an Profilin gegenseitig aus (Lassing and Lindberg, 1985; Lassing and Lindberg, 1988; Machesky et al., 1990), interferiert dagegen nicht mit der Wechselwirkung mit poly-L-Prolin-Motiven. Diese wird durch eine aus N- und C-Termini gebildeten, hydrophoben Region vermittelt, in der konservierte und invariante Aminosäuren liegen.

1.2 Wechselwirkung mit Aktin und Einfluß von Profilin auf das Mikrofilamentsystem

Struktur und Dynamik des Mikrofilamentsystems erfordern eine schnelle, regulierte Aktinpolymerisation, was durch das Zusammenspiel assoziierter und regulatorisch wirkender Proteine erfolgt. Es wurde ursprünglich angenommen, dass die wesentliche Funktion des Profilins infolge seiner Affinität zu G-Aktin in der Stabilisierung des freien G-Aktin-Pools liegt und damit eine Erhöhung der kritischen G-Aktin-Konzentration, bei der sich Assoziation und Dissoziation der Monomere an den Aktinfilamentenden im Gleichgewicht befinden, bewirkt. In diesem Zusammenhang wird dem G-Aktin-bindenden Protein Thymosin $\beta 4$ (Low et al., 1981, Safer et al., 1991) aufgrund seiner höheren Bindungsaffinität zu G-Aktin und höheren zellulären Konzentrationen im Vergleich zum Profilin eine wichtigere Funktion

beigemessen, zumal Thymosin $\beta 4$ mit höherer Affinität an ATP- als an ADP-gebundenes Aktin bindet (Cassimeris et al., 1992; Pantaloni and Carlier, 1993; Carlier et al., 1993).

Der Einfluß von Profilin auf das Mikrofilamentsystem scheint komplexer Natur zu sein. *In vitro* Untersuchungen zeigen in Abhängigkeit der Ionenbedingungen und der Anwesenheit anderer Aktin-bindender Proteine eine Inhibierung der Aktinpolymerisation durch Bindung von G-Aktin, wodurch das thermodynamische Gleichgewicht verschoben wird, so dass es zu einer Depolymerisation der Aktinfilamente und Hemmung der Aktinpolymerisation kommt (Goldschmidt-Clermont et al., 1991b; Nishida et al., 1984; Pollard and Cooper, 1984). Andererseits zeigen Profilin-Aktin Komplexe höhere Affinität zum rasch wachsenden (+)-Ende der Aktinfilamente und vermitteln polymerisationsfördernde Eigenschaften. Durch Komplexbildung mit G-Aktin wird die ATPase-Aktivität des Aktins inhibiert, ein Nukleotidaustausch induziert und somit ATP-Aktin generiert, dass eine höhere Affinität zu F-Aktin aufweist.

Unabhängig von diesen unterschiedlichen Beobachtungen ist der Einfluß von Profilin auf das Gleichgewicht zwischen monomerem G-Aktin und F-Aktin unbestritten und beide Eigenschaften, die die Aktindynamik direkt beeinflussen – G-Aktin-Bindung und Modulation des Nukleotidaustauschs – sind notwendig für die Lebensfähigkeit der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* (Lu and Pollard, 2001).

Wie sich die unterschiedlichen Effekte von Profilin auf die Aktinpolymerisation *in vivo* auswirken, hängt von einer Vielzahl verschiedener Parameter – dem lokalen Profilin/Aktin-Verhältnis, der Verfügbarkeit an ADP und ATP, der Konzentration an Thymosin $\beta 4$ und anderer Aktin-modulierender Proteine – ab. Da diese in verschiedenen Kompartimenten der Zelle stark variieren, kann Profilin in manchen Bereichen der Zelle die Polymerisation inhibieren, in anderen dagegen polymerisationsfördernd wirken (Giuliano and Taylor, 1994). So konnten durch Veränderung des Expressionslevels von Profilin durch Depletion oder Überexpression in Zellen drastische phänotypische Effekte erzielt werden, wie z.B. Abnahme des F-Aktin-Gehalts, Inhibition der Ausbildung von Lamellipodien, Einfluß auf die Zellgröße und die Lebensfähigkeit (Cao et al., 1992; Cooley et al., 1992; Finkel et al., 1994; Haarer et al., 1990; Haugwitz et al., 1994; Verheyen and Cooley, 1994).

1.3 Profilin als Mittler zwischen Mikrofilamentsystem und Signaltransduktion

Die Wechselwirkung mit sauren Phospholipiden bringt Profilin in unmittelbaren Zusammenhang mit PIP₂-abhängigen Signalketten. Dies steht im Kontext mit Lokalisationsstudien, in denen Profilin in Bereichen einer hohen Dynamik der Plasmamembran nachgewiesen werden konnte (Buss et al., 1992), die durch ein dynamisches Aktinnetzwerk bedingt ist.

Basierend auf Strukturdaten von *Acanthamoeba* Profilin I und II wurde die Bindungsdomäne für saure Phospholipide auf positiv geladene Oberflächenbereiche eingeengt (Fedorov et al., 1994; Vinson et al., 1993). Durch Mutationsanalysen an *Saccharomyces* und humanem Profilin konnte der direkte Einfluß basischer Aminosäuren (Lysin 72 bzw. Arginin 88 im humanen Profilin) gezeigt werden (Haarer et al., 1993; Sohn et al., 1995). Profilin bindet mit unterschiedlichen Affinitäten an verschiedene Phosphoinositide, so ist die Affinität zu Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat und Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat höher als zu Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. Aus Abbildung 1 wird ersichtlich, dass sich die potentiellen Bindungsdomänen für Aktin und saure Phospholipide überlappen, so dass sich eine simultane Wechselwirkung von Profilin mit G-Aktin und Phosphoinositiden ausschließt. Die Bindung von PIP₂ führt *in vitro* zu einer Dissoziation des Profilin-Aktin-Komplexes (Lassing and Lindberg, 1985; Lassing and Lindberg, 1988; Machesky et al., 1990), vermutlich infolge einer Konformationsänderung des Profilins (Raghunathan et al., 1992).

Die Bindung von PIP₂ an Profilin verhindert die Hydrolyse von PIP₂ durch nicht-phosphorylierte Phospholipase C γ 1 (Goldschmidt-Clermont et al., 1990). Infolge einer Aktivierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinase durch externe Stimuli und einer nachfolgenden Phosphorylierung der Phospholipase C γ 1 wird die Hydrolyse des Profilin gebundenen PIP₂ induziert (Goldschmidt-Clermont et al., 1991a). Folglich könnte Profilin durch Wechselwirkung mit G-Aktin regulatorisch auf die Aktinpolymerisation wirken und die bei der Hydrolyse von PIP₂ entstehenden Metaboliten Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) Einfluß auf den intrazellulären Ca²⁺-Spiegel und Phosphorylierungsereignisse durch Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) nehmen.

1.4 Interaktion mit poly-L-Prolin Liganden

Ursprünglich wurde die Bindung von Profilin an poly-L-Prolin zur Affinitätsreinigung genutzt. Durch die Identifizierung des *vasodilator stimulated phosphoprotein* (VASP) als Ligand für das poly-L-Prolin Bindungsmotiv (Reinhard et al., 1995) bekam diese Eigenschaft der Profileine biologische Signifikanz. In der Zwischenzeit konnte eine Vielzahl verschiedener prolinreicher Liganden wie u.a. die VASP-verwandten Enabled und Mena (Gertler et al., 1996), N-WASP (Suetsugu et al., 1998), WAVE/Scar (Miki et al., 1998), Verprolin/WIP, Mitglieder der Formin-Familie Diaphanous/p140mDia (Krebs et al., 2001; Watanabe et al., 1997), Cappucino (Manseau et al., 1996), Bn1p (Evangelista et al., 1997), Bnr1p (Imamura et al., 1997) und Cdc12p (Balasubramanian et al., 1994; Chang et al., 1997), Drebrin (Mammoto et al., 1998), SMN (Gieseemann et al., 1999), Aczonin (Wang et al., 1999) und das mRNA-bindende Protein Prpp (Zhao et al., 2001) identifiziert werden. Für die Interaktion mit einigen dieser Liganden wurde eine biologische Bedeutung gezeigt, jedoch muß die Vielzahl unterschiedlicher prolinreicher Liganden für ein lediglich 12-16kDa großes Protein kritisch betrachtet werden.

Die essentielle Funktion der Wechselwirkung zwischen Profilin und prolinreichen Liganden zeigen Mutationsanalysen in der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* (Lu and Pollard, 2001). Eine Reduktion der Affinität zu poly-L-Prolin Peptiden führte dabei zu einem letalem Phänotyp.

Mittels Mutationsanalysen (Bjorkegren et al., 1993; Haarer et al., 1993), NMR-Studien (Archer et al., 1994; Domke et al., 1997; Metzler et al., 1994) und der Kristallstruktur eines Komplexes aus humanem Profilin I und poly-L-Prolin (Mahoney et al., 1997) wurde die Bindungsdomäne auf einen hydrophoben Bereich, der die N- und C-terminal gelegenen α -Helices umfasst, eingegrenzt. Für Profilin I konnte die direkte Wechselwirkung aromatischer Aminosäuren (Trp3, Tyr6, Trp31, His133, Tyr139) mit poly-L-Prolin identifiziert werden (Bjorkegren et al., 1993; Cedergren-Zeppezauer et al., 1994; Schutt et al., 1993; Thorn et al., 1997). Die höhere Affinität von Profilin IIa zu prolinreichen Peptiden (Jonckheere et al., 1999; Lambrechts et al., 1997) wird, basierend auf Strukturdaten, auf eine zusätzliche aromatische Aminosäure (Tyr29 in Profilin IIa) zurückgeführt (Nodelman et al., 1999). Neben unterschiedlichen Affinitäten zu poly-L-Prolin konnte für die Profilin-Isoformen I und IIa eine unterschiedliche Ligandenspezifität nachgewiesen werden (Suetsugu et al., 1998; Witke et al., 1998). Molekular wird diese Spezifität auf die unterschiedlichen isoelektrischen Punkte der beiden Isoformen (humanes Profilin I: pI 8.4; Profilin IIa: pI 5.9)

und Unterschiede in geladenen und hydrophoben Aminosäuren innerhalb und in räumlicher Nähe zur poly-L-Prolin Bindungsdomäne zurückgeführt (Nodelman et al., 1999). Sequenzunterschiede zwischen Profilin I und IIa ermöglichen zudem eine Isoform-spezifische Regulation der Interaktion mit prolinreichen Liganden durch Phosphorylierung. Profilin I wird - induziert durch EGF-Stimulation - an Tyr139 phosphoryliert, wodurch die Interaktion mit poly-L-Prolin inhibiert wird (Bjorkegren-Sjogren et al., 1997). In Profilin IIa findet man an dieser Stelle ein Valin (Mensch) bzw. ein Phenylalanin (Rind, Maus). Mittels *in vitro* Studien konnte eine PKC-abhängige Phosphorylierung von Serin 138, eine in Mensch, Rind und Maus konservierte Aminosäure innerhalb der poly-L-Prolin Bindungsdomäne, die auch in Profilin IIa enthalten ist, nachgewiesen werden (Hansson et al., 1988; Singh et al., 1996; Vemuri and Singh, 2001).

Die biologische Relevanz der Interaktion zwischen Profilin und prolinreichen Liganden ist dabei mannigfaltiger Natur. In Motilitätsexperimenten in mit Listerien infizierten Zellen colokalisiert Profilin nicht nur – in Abhängigkeit der Listerienmotilität – mit VASP (Geese et al., 2000), zudem zeigen VASP-Mutanten, die nicht mehr an Profilin binden, verminderte Listeriengeschwindigkeit (Geese et al., 2002). So übt Profilin nicht nur direkten Einfluß auf die Aktinpolymerisation aus, sondern scheint auch durch die Interaktion mit VASP indirekt regulatorisch wirken zu können. Vermittelt durch die Interaktion von Profilin mit dem Diaphanous Protein mDia1 besteht eine Verbindung zwischen der kleinen GTPase Rho und dem Cytoskelett (Krebs et al., 2001), wodurch die Rolle des Profilins als Bindeglied zwischen Signalkaskaden und dem Mikrofilamentsystem bei der Ausbildung subzellulärer Aktinstrukturen untermauert wird. Durch die Interaktion mit dem *survival motor neuron protein* SMN (Giesemann et al., 1999) und dem *proline-rich RNA binding protein* Prp (Zhao et al., 2001) kommt Profilin auch eine mögliche Funktion bei der RNA-Prozessierung und mRNA-Lokalisierung zu. Insbesondere die Wechselwirkung mit SMN weist auf nukleäre Aufgaben von Profilin hin, da beide Proteine neben einer Colokalisation im Cytoplasma auch in *nuclear gems* detektiert werden konnten (Giesemann et al., 1999).

Desweiteren zeigten Burke und Mitarbeiter eine direkte Verbindung zwischen Aktin und der Genexpression des *Respiratory Syncytial Virus* RSV (Burke et al., 1998; Burke et al., 2000). Die Transkription des RSV-Genoms wies dabei – wie bereits erwähnt – eine direkte Abhängigkeit von Aktin auf, wohingegen Profilin nicht essentiell ist. Jedoch wurde die Transkriptionsrate durch Kompetitionsassays mit anti-Profilin Antikörpern oder poly-L-Prolin Peptiden um 60–80% reduziert. Dies weist auf eine mögliche Verbindung zwischen Profilin und Transkriptionsereignissen hin, die durch einen prolinreichen Liganden vermittelt wird.

Ein in unserer Arbeitsgruppe identifizierter, neuer prolinreicher Ligand für Profilin, der Homologie zur DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors c-Myb aufweist, könnte eine Rolle bei Profilin-vermittelten, regulatorischen Einflüssen auf die Transkription spezifischer Zielgene spielen.

2 Transkriptionsfaktoren der Myb-Familie

Eukaryotische Transkriptionsfaktoren werden entsprechend ihrer DNA-Bindungsdomäne in verschiedene Familien eingeteilt. Die Diversität ihrer Funktion wird überwiegend von anderen, regulatorischen Domänen vermittelt, da sich Mitglieder einer Familie meist kaum in ihren DNA-Bindungsmotiven unterscheiden. Aufgrund der Struktur ihrer DNA-Bindungsdomäne werden Proteine der Myb-Familie zu den Helix-turn-Helix Transkriptionsfaktoren mit Tryptophancluster gezählt.

Ursprünglich wurde das erste myb-Gen (v-myb^{AMV}) als transformierendes Gen des *avian myeloblastosis virus* AMV identifiziert, das akute myelotische Leukämie induziert. Zudem konnte im Genom des Retrovirus E26 ein ähnliches Onkogen (v-myb^{E26}) identifiziert werden, das für ein Fusionsprotein aus Gag, v-Myb und Ets-1 kodiert und erythroblastische Leukämie induziert. Beide Onkogene, v-myb^{AMV} und v-myb^{E26}, stellen N- und C-terminal verkürzte Versionen des zellulären, in Vertebraten konservierten c-Myb dar.

Mit A-Myb und B-Myb konnten in Vertebraten Proteine identifiziert werden, die Homologie mit anderen funktionellen Regionen in c-Myb aufweisen: neben der N-terminal gelegenen DNA-Bindungsdomäne beinhalten sie einen transkriptionsaktivierenden Bereich, sowie eine negativ regulierende Domäne im C-Terminus (Abb. 2).

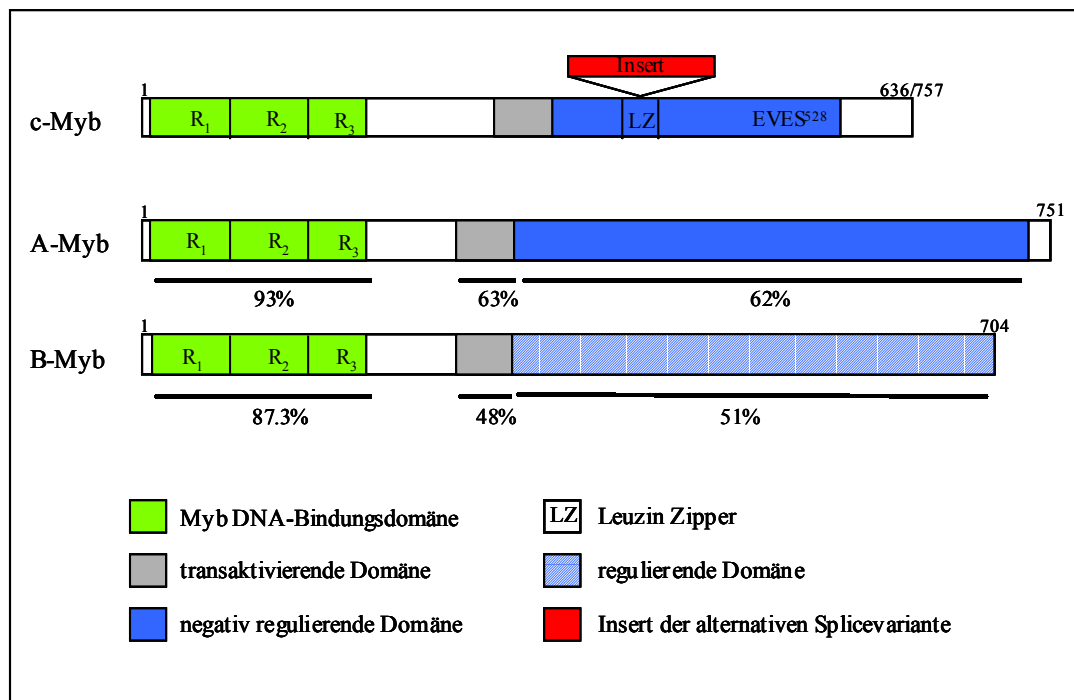


Abb. 2: Schematische Darstellung von A-, B- und c-Myb und struktureller Vergleich der Myb Genprodukte. Balken geben den jeweiligen Homologiebereich zu c-Myb mit der entsprechenden Homologie in Prozent an. (modifiziert nach Oh and Reddy, 1999)

Das vorrangig translatierte Genprodukt des c-myc Protoonkogens ist ein 75kDa nukleär lokalisiertes Protein, das in den meisten hämatopoetischen Geweben exprimiert wird (Westin et al., 1982). Zudem konnte eine alternative Spleißvariante, die einen 121 Aminosäuren Einschub im Leuzin-Zipper Motiv aufweist, identifiziert werden (Dasgupta and Reddy, 1989; Dudek and Reddy, 1989a; Dudek and Reddy, 1989b; Rosson et al., 1987; Shen-Ong, 1987; Shen-Ong et al., 1989). Analog zu c-Myb lokalisieren A-Myb (95kDa) und B-Myb (93kDa) im Zellkern. Beide Gene beinhalten zwar das Exon, das in c-Myb alternativ gespleißt werden kann, jedoch konnten keine entsprechenden Genprodukte nachgewiesen werden. Die unterschiedliche Funktion der Myb-Proteine spiegelt sich neben Differenzen in ihrer Primärstruktur auch in den unterschiedlichen Expressionsmustern wider. Das am besten untersuchte Protein c-Myb wird vorwiegend in unreifen hämatopoetischen Zellen exprimiert, wobei der Transkriptionslevel während der Reifung und Differenzierung dieser Zellen drastisch sinkt (Craig and Bloch, 1984; Duprey and Boettiger, 1985; Gonda and Metcalf, 1984; Sheiness and Gardinier, 1984; Westin et al., 1982). Die wichtige Rolle von c-Myb während der Hämatopoese konnte durch *knock out* Experimente gezeigt werden, in denen sich die homozygote Mutation als embryonal letal erwies und Störungen in der erythroiden und myelotischen Entwicklung aufzeigte (Mucenski et al., 1991). Für A-Myb konnte ebenso eine gewebsspezifische Expression überwiegend in männlichen Keimzellen und Brustepithelzellen

von schwangeren Mäusen gezeigt werden (Mettus et al., 1994; Toscani et al., 1997), niedrige Expressionslevel im Ovar, Gehirn und in *germinal centers* der Milz (Foos et al., 1994; Mettus et al., 1994; Trauth et al., 1994). A-Myb defiziente Mäuse sind lebensfähig, weisen aber Defekte in der Spermatogenese und Milchdrüsenentwicklung auf (Toscani et al., 1997). Im Gegensatz zu c-Myb und A-Myb wird B-Myb ubiquitär exprimiert (Nomura et al., 1988).

2.1 Struktureller Aufbau der DNA-Bindungsdomäne

Die Sequenz-spezifische DNA-Bindung der Myb-Transkriptionsfaktoren wird durch drei repetitive Elemente R₁, R₂ und R₃ (*repeats*) vermittelt, die jeweils aus 50 - 53 Aminosäuren bestehen und konservierte Tryptophanreste in definierten Abständen enthalten. Die drei *repeats* enthalten jeweils drei α -Helices, von denen die letzten beiden ein Helix-turn-Helix Motiv ausbilden (Frampton et al., 1991; Gabrielsen et al., 1991; Ogata et al., 1994). Der erste *repeat* vermittelt DNA-Bindung (Gabrielsen et al., 1991; Howe et al., 1990; Kanei-Ishii et al., 1990; Saikumar et al., 1990), wogegen der zweite und dritte essentiell und ausreichend für die Erkennung des minimalen Konsensus-DNA-Erkennungsmotivs (T/C)AAC(G/T)G sind (Biedenkapp et al., 1988). Die Wechselwirkung mit dieser Sequenz wird durch die Helix-turn-Helix Motive in R₂ und R₃ vermittelt, wobei die Tryptophanreste bei der Ausbildung eines hydrophoben Kerns, der in die DNA-Bindung involviert ist, eine entscheidende Rolle spielen (Ogata et al., 1992; Ogata et al., 1994). Direkte Interaktionen mit DNA konnte in c-Myb für die Aminosäuren Lysin₁₂₈ (R₂), Lysin₁₈₂ (R₃) und Asparagin₁₈₃ (R₃) gezeigt werden. Bei der Wechselwirkung mit dem Konsensus-Motiv kommen den beiden *repeats* unterschiedliche Bedeutung zu. R₃ bindet an das essentielle Kernmotiv (T/C)AAC, während R₂ mit dem weniger konservierten, 5'-gelegenen Sequenzmotiv interagiert, das eher modulierend wirkt und Einfluß auf die Halbwertszeit des Protein-DNA-Komplexes nimmt (Ording et al., 1994).

Mitglieder der Myb-Transkriptionsfaktoren konnten durch ihre Homologie in der N-terminal gelegenen DNA-Bindungsdomäne bereits in verschiedenen Spezies wie Pflanzen oder Hefen und sogar im Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* (Stober-Grasser et al., 1992) identifiziert werden. Phylogenetische Untersuchungen zeigen unterschiedliche evolutionäre Verläufe zwischen Tieren und Pflanzen. Während Proteine der Myb-Familie in Tieren von einem gemeinsamen Vorläufer abzustammen scheinen, weisen pflanzliche Myb-Proteine lediglich Homologien in ihren DNA-Bindungsdomänen auf (Rosinski and Atchley, 1998). Dies spiegelt sich auch im Aufbau dieser Domänen wider. Prinzipiell besteht die DNA-

Bindungsdomäne in Säugern aus drei *repeats*, wogegen sich diese Domäne in Pflanzen aus zwei *repeats* zusammensetzt. Zudem wurden bereits pflanzliche Myb-Proteine mit nur einem einzigen funktionellen Modul identifiziert (Baranowskij et al., 1994; Feldbrugge et al., 1997; Kirik and Baumlein, 1996; Lugert and Werr, 1994).

2.2 Regulation der c-Myb-vermittelten Aktivierung durch posttranslationale Modifikationen und Ligandenwechselwirkungen

Der DNA-bindenden Domäne kommen neben der Erkennung spezifischer DNA-Motive auch weitere regulatorische Funktionen zu. Zwar weisen die Bindungsdomänen von c-Myb und v-Myb^{AMV} die gleiche Erkennungsspezifität auf, jedoch sind Punktmutationen notwendig für die Fähigkeit Zellen zu transformieren (Introna et al., 1990). Zudem wird die DNA-Bindung von c-Myb durch Phosphorylierung der Serinreste 11 und 12 durch die Caseinkinase II (CK-II) inhibiert. Diese Phosphorylierungsstelle ist in fast allen Onkogen-aktivierten Myb-Proteinen deletiert, so dass eine CK-II unabhängige DNA-Bindung erfolgt. Da die CK-II-Aktivität von Wachstumsfaktoren moduliert wird, könnte die Deletion dieser Phosphorylierungsstelle c-Myb von seiner physiologischen Regulation entkoppeln (Lüscher et al., 1990).

Neben der DNA-Bindung weisen Proteine der Myb-Familie transkriptionsaktivierende Eigenschaften auf. Diese Aktivierungsdomänen setzen sich aus sauren Aminosäuren, wie für c-Myb gezeigt (Kalkbrenner et al., 1990; Sakura et al., 1989), Prolin- oder Glutamin-reichen Sequenzbereichen zusammen (Baranowskij et al., 1994; Ptashne, 1988). Wie im Falle von c-Myb konnte in vielen Myb-verwandten Proteinen die transkriptionelle Aktivität einer sauren Region zugewiesen werden. Für c-Myb wurde eine direkte Wechselwirkung der sauren Region mit *CREB-binding protein* (CBP), einem transkriptionellen Coaktivator, gezeigt, wodurch eine Verbindung zur basalen Transkriptionsmaschinerie der RNA-Polymerase II hergestellt werden kann (Dai et al., 1996; Oelgeschlager et al., 1996a).

Eine dritte, regulatorische Domäne konnte im C-terminalen Bereich von c-Myb identifiziert werden. Diese Region ist in den Myb-Proteinen A- und B-Myb konserviert und zeigt im mittleren Bereich höchste Homologie (siehe Abb. 2). Eine Deletion dieser Domäne führt sowohl für A-Myb, als auch für c-Myb zu einem drastischen Anstieg der transkriptionellen Aktivierung (Oh and Reddy, 1997; Takahashi et al., 1995). Dagegen scheint der C-Terminus von B-Myb verschiedene funktionelle, regulatorische Elemente zu enthalten, die

unterschiedliche Wirkung auf die Aktivität ausüben. Eine C-terminale Deletion führt zu einer Reduktion der transkriptionellen Aktivität und weist diesem Bereich eine positiv regulierende Funktion zu (Oh and Reddy, 1998). Andererseits führt die Deletion eines kleinen, C-terminal der konservierten Region gelegenen Fragmentes zu einem Anstieg der transkriptionellen Aktivität (Lane et al., 1997; Ziebold et al., 1997).

Eine negativ autoregulierende Wirkung konnte einem Leuzin-Zipper ähnlichem Motiv in c-Myb zugeordnet werden. Diese Autoregulation beruht auf einer durch den Leuzin-Zipper vermittelten Homodimerbildung, wodurch die DNA-Bindung inhibiert wird (Kanei-Ishii et al., 1992; Nomura et al., 1993). Eine modulierende Wirkung wird in diesem Zusammenhang p160 und einem proteolytischen N-terminalem Fragment p67 zugesprochen (siehe Abb. 3), die an das Leuzin-Zipper Motiv in c-Myb binden und zumindest im Fall von p67 die transkriptionelle Aktivität von c-Myb negativ beeinflussen (Favier and Gonda, 1994; Tavner et al., 1998). Mit dem Transkriptionsfaktor ATBF1 konnte ein weiterer Ligand des Leuzin-Zipper Motivs in v-Myb identifiziert werden, durch dessen Bindung die transkriptionelle Aktivität reprimiert wird (Kaspar et al., 1999). Die Funktion des Leuzin-Zippers als regulierendes Element wird durch eine alternative Spleißvariante, bei der das Dimerisierungsmotiv durch Insertion von 121 Aminosäuren unterbrochen wird, bestärkt, da diese eine höhere transkriptionsaktivierende Wirkung im Vergleich zu c-Myb aufweist (Woo et al., 1998). Als weiteres Element vermittelt das EVES-Motiv in c-Myb sowohl intra- als auch intermolekulare Regulation und nimmt offensichtlich, abhängig vom Phosphorylierungszustand, Einfluß auf die transkriptionelle Aktivität von c-Myb. Das in diesem Motiv enthaltene Serin (S⁵²⁸) wird *in vivo* und *in vitro* phosphoryliert und ist - zumindest *in vitro* - Substrat der p42^{mapk} (Aziz et al., 1995). Analysen mit Punktmutanten zeigten eine erhöhte transkriptionelle Aktivität infolge der Substitution S528A (Migliarese et al., 1996). Zudem wird postuliert, dass durch die intramolekulare Wechselwirkung von c-Myb, die durch das N-terminal gelegene EVES-Motiv und der DNA-Bindungsdomäne vermittelt wird (siehe auch Abb. 3), und dadurch bedingte konformationelle Änderungen, die Wechselwirkung zwischen c-Myb und dem transkriptionellen Cofaktor p100 beeinflusst wird (Dash et al., 1996).

Neben diesen regulatorischen Einflüssen auf die transkriptionelle Aktivität infolge posttranslationaler Modifikationen, intramolekularer Wechselwirkung und Dimerisierung konnten Interaktionspartner für c-Myb identifiziert werden, deren Bindung modulierend auf die transkriptionsaktivierenden Eigenschaften wirkt. Die vielseitigen Funktionen von c-Myb bei Zellproliferation und Differenzierungsprozessen, sowie seine transformierende Aktivität

scheinen durch Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren oder direkten Bindungspartnern reguliert zu sein. Modulierender Einfluß auf die transkriptionelle Aktivität von c-Myb konnte der Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren, transkriptionellen Cofaktoren und regulatorisch wirkenden Proteinen zugeordnet werden (siehe Abb. 3).

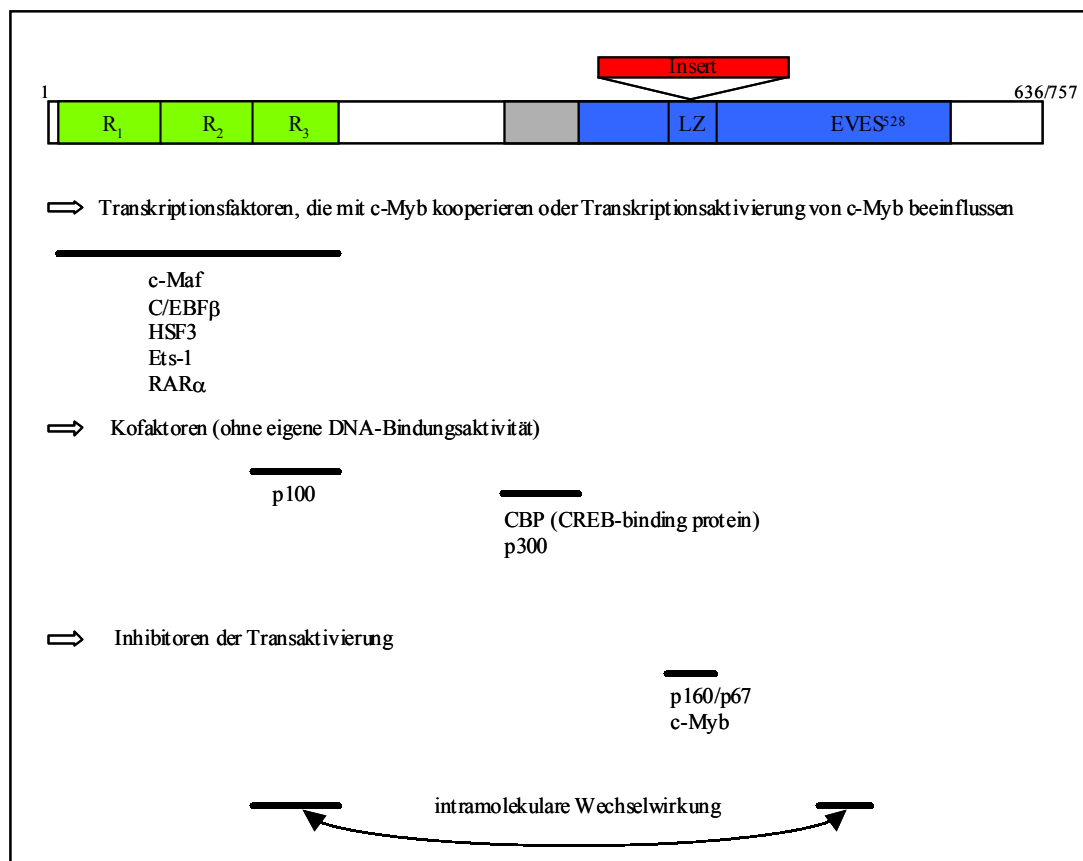


Abb. 3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von c-Myb. Die Bindungsregionen der aufgeführten Liganden sind durch Balken dargestellt.

Die Interaktion der dargestellten Bindungspartner wirkt sich unterschiedlich auf die DNA-Bindung und die transkriptionelle Aktivität von c-Myb aus. So konnte für den Transkriptionsfaktor C/EBPβ eine direkte Bindung an die DNA-Bindungsdomäne von c-Myb und ein synergistischer Effekt bei Aktivierung spezifischer Zielgene wie dem *mim-1* Gen gezeigt werden (Burk et al., 1993; Mink et al., 1996; Ness et al., 1993). C/EBPβ und c-Myb binden an benachbarte Motive im *mim-1* Promotor und sind beide für eine effiziente Expression des *mim-1* Gens erforderlich. Da es sich bei c-Myb um ein Onkoprotein handelt und es als solches die Fähigkeit aufweist, Zellproliferation zu induzieren, ist eine entsprechende Regulation der transkriptionellen Aktivität von c-Myb in normalen Zellen

erforderlich, um unkontrolliertes Zellwachstum zu inhibieren. Zudem wird c-Myb in unreifen, proliferierenden Zellen exprimiert und Überexpression von c-Myb oder v-Myb kann in manchen differenzierten Zellen eine Dedifferenzierung induzieren (Beug et al., 1987; Ness et al., 1987; Ness et al., 1993). Entsprechend scheint eine Inaktivierung von c-Myb während der Differenzierung normaler hämatopoetischer Zellen erforderlich. In diesem Kontext konnte ein negativer Einfluß auf die transkriptionelle Aktivität von c-Myb auf die Transkriptionsfaktoren RAR α und c-Maf, die Differenzierung induzieren, zurückgeführt werden (Hedge et al., 1998; Pfitzner et al., 1998). Desweiteren wurden die transkriptionellen Cofaktoren CBP/p300 und p100 identifiziert, die mit c-Myb und v-Myb interagieren und eine wichtige Rolle bei der Regulation von Myb-Proteinen im Bezug auf Transformation und Tumorigenizität einnehmen. Die Histon-Acetyltransferasen CBP und das nahe verwandte p300 sind Cofaktoren für verschiedene Transkriptionsfaktoren und transformierende Proteine (Arany et al., 1994; Ogryzko et al., 1996) und acetylieren mehrerer Lysinreste in der negativ regulierenden Domäne von c-Myb (Kiewitz and Wolfes, 1997; Oelgeschlager et al., 1996a). Diese posttranslationale Modifikation verstärkt die Bindung von CBP an c-Myb und führt zu einer verstärkten DNA-Bindung und transkriptionellen Aktivität (Sano and Ishii, 2001; Tomita et al., 2000). Durch seine Interaktion mit C/EBP β (Dai et al., 1996; Kiewitz and Wolfes, 1997; Mink et al., 1996; Oelgeschlager et al., 1996a; Oelgeschlager et al., 1996b) könnte CBP zudem eine Brückenfunktion bei kooperativen Effekten zwischen c-Myb und C/EBP β oder anderen Transkriptionsfaktoren einnehmen. Als weiterer Cofaktor beeinflusst p100, das *in vitro* an den generellen Transkriptionsfaktor TFIIE bindet, durch Interaktion mit der DNA-Bindungsdomäne von c-Myb und v-Myb deren transkriptionelle Aktivität (Dash et al., 1996; Levenson et al., 1998). Da p100 das bereits erwähnte EVES-Motiv enthält, das in c-Myb bei der Ausbildung einer intramolekulare Wechselwirkung beteiligt ist und dadurch negativ regulierend wirkt (Migliarese et al., 1996), könnte die Interaktion zwischen p100 und c-Myb durch strukturelle Veränderungen aufgrund der intramolekularen Wechselwirkung von c-Myb reguliert werden. Als möglicher Effektor konnte in diesem Zusammenhang die Serin/Threonin-Kinase Pim-1, ein Ligand von p100, identifiziert werden, deren ektopische Expression in hämatopoetischen Zellen eine p100-abhängige Stimulation der transkriptionellen Aktivität von c-Myb induziert (Levenson et al., 1998).

Die exemplarisch aufgeführten Liganden von c-Myb und die dargestellten posttranslationalen Modifikationen geben einen kleinen Einblick in die Komplexität regulatorischer Mechanismen, die modulierend auf die transkriptionelle Aktivität von c-Myb wirken.

2.3 Zelluläre Zielgene von c-Myb

Mittels verschiedener Ansätze wurden einige zelluläre Zielgene von c-Myb und v-Myb identifiziert. So konnte die v-Myb induzierte Aktivierung des *mim-1* Gens und drei Myb-Bindungsregionen im *mim-1* Promotor mit unterschiedlichen Affinitäten nachgewiesen werden (Ness et al., 1989). Im Gegensatz zu dem verkürzten v-Myb, aktiviert c-Myb das *mim-1* Gen nur in Kooperation mit Ets-2 (Dudek et al., 1992) oder C/EBP β (Burk et al., 1993). Eine autoregulatorische Funktion von c-Myb auf die Aktivierung des eigenen Gens wird konträr diskutiert. Während in Fibroblasten eine Aktivierung gezeigt werden konnte (Nicolaidis et al., 1991), weisen Untersuchungen in T-Zellen auf eine negative Regulation des c-myb Gens hin (Guerra et al., 1995). Auch für c-Myc wurde eine c-Myb induzierte Expression in T-Zellen gezeigt (Evans et al., 1990) und Myb-Bindungsstellen im Promotor identifiziert (Cogswell et al., 1993; Nakagoshi et al., 1992). Jedoch ist die Rolle von c-Myb bei der Regulation von c-Myc unklar (Reed et al., 1985).

Auch für verschiedene T-Zell Oberflächenmarker konnte eine c-Myb-abhängige Expression gezeigt werden. Sowohl CD4 (Nakayama et al., 1993; Siu et al., 1992), als auch CD34 (He et al., 1992; Melotti et al., 1994) beinhalten Myb-Bindungsmotive in ihren Promotoren und werden durch c-Myb transaktiviert.

Durch Untersuchungen differentiell exprimierter Gene zwischen c-Myb-defizienten und Wildtyp Zellen konnten weitere potentielle Zielgene von c-Myb identifiziert werden, darunter auch der Transkriptionsfaktor GATA-1, der in c-myb^{-/-}-Zellen herunterreguliert wird (Lin et al., 1996).

3 Aufgabenstellung

Die Funktion des Profilins im Hinblick auf die Aktinpolymerisation im Cytoplasma ist bisher detailliert beschrieben worden, dagegen ist wenig über seine nukleären Aufgaben bekannt. Lokalisationsstudien und die Colokalisation mit SMN in *nuclear gems* geben erste Hinweise auf potentielle Funktionen im Zellkern. Die Identifizierung von Δ POP1 im *Yeast two-hybrid* System als Profilin-Ligand und die Lokalisation dieses bisher unbekannten Proteins im Zellkern (Marquardt, 1998) unterstützen die Hypothese, dass Profilin Aufgaben im Kern erfüllt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das vollständige Protein p42POP, ein Mitglied der Familie der Myb-Transkriptionsfaktoren, näher charakterisiert werden. Insbesondere sollten folgende Aspekte analysiert werden:

- (1) Aufklärung der Genstruktur
- (2) Charakterisierung von p42POP als Mitglied der Proteinfamilie der Myb-Transkriptionsfaktoren
- (3) Funktionalität verschiedener, durch Datenbankrecherchen identifizierter Homologiemotive
- (4) Modulation der Interaktion zwischen p42POP und den cytoskelettalen Proteinen Profilin und Aktin

Da aufgrund der großen Anzahl prolinreicher Liganden für Profilin die biologische Relevanz dieser Interaktionen kritisch betrachtet werden muß, sollte der Einfluß der Phosphorylierung von Profilin I und IIa auf deren Ligandenbindungsverhalten näher untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollten folgende Gesichtspunkte untersucht werden:

- (1) Generierung verschiedener Profilin I-Mutanten zur Analyse der PKC-Phosphorylierungsstelle Serin 138 (Singh et al., 1996)
- (2) *In vitro* Phosphorylierungsstudien von Profilin I und IIa
- (3) Einfluß der *in vitro* Phosphorylierung auf das Bindungsverhalten an poly-L-Prolin und G-Aktin

Diese Aspekte sollten Einblick in mögliche Regulationsmechanismen zur Profilin-Liganden-Interaktion liefern, die dazu beitragen können, die zellulären Funktionen von p42POP und der Profile besser verstehen zu können.

II MATERIAL UND METHODEN

1 Material

1.1 Chemikalien und Enzyme

Die eingesetzten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Difco (Hamburg), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), ICN (Eschwege) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Bezugsquelle für Enzyme waren, sofern nicht anders vermerkt, die Firmen New England Biolabs (Bad Schwalbach), Life Technologies (Eggenstein), Stratagene (Heidelberg), Boehringer (Mannheim), PAA Laboratories (Cölbe), Promega (Mannheim) und Appligene (Heidelberg).

Der Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen mittels des *Yeast two-hybrid* Systems wurde mit dem „Matchmaker two-hybrid System“ (Clontech, Heidelberg) durchgeführt.

1.2 Bakterien

Zur Klonierung und Expression rekombinanter Proteine wurden die *Escherichia coli*-Stämme *XL1-blue*, *DH5 α* , *BL21 (DE3)* und *MI5(pREP4)* eingesetzt.

Die Stämme weisen folgende relevante genotypische Merkmale auf:

DH5 α : supE44 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) HsdR 17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 (Hanahan, 1983)

XL1-blue: supE44 hsdR17 recA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F'[proAB⁺ lacI^q LacZ Δ M15 tn10(tet^r)] (Bullock et al., 1987)

BL21 (DE3): F⁻, ompT, r_B⁻m_B⁻hsdS gal (λ cIts857, ind1, Sam7, nin5, lac UV5-T7 gene 1) (Studier and Moffatt, 1986)

MI5(pREP4): NaI^S, Str^S, Rif^S, Thi⁻, Ara⁺, Gal⁺, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺, (Villarejo and Zabin, 1974)

Zur Anzucht von *E. coli* wurden folgende Medien verwendet:

2xYT-Vollmedium	LB-Medium (Luria Bertani).
16 g Trypton (Difco)	10g Trypton
10 g Hefeextrakt (Difco)	5 g Hefeextrakt
10 g NaCl	10 g NaCl
auf 1 l mit H ₂ O	auf 1 l mit H ₂ O

Für die Selektion rekombinanter Klone wurde das Medium in Abhängigkeit des Vektors mit 30 µg Kanamycin/ml oder 150 µg Ampicillin/ml supplementiert. Zur Herstellung von LB-Agar-Platten wurde dem Medium 1.5% (w/v) Agar-Agar zugegeben.

1.3 Hefen

Die Protein-Protein-Wechselwirkungsstudien mittels des *Yeast two-hybrid* Systems („Matchmaker two-hybrid System“, Clontech) wurden mit den *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen HF7c und Y187 mit den folgenden relevanten Genotypen durchgeführt.

- HF7c: MATa, ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3,112, gal4-542, gal80-538, LYS2::GAL1-HIS3, URA3:: $(\text{GAL4 } 17\text{-mers})_3\text{-CYC1-lacZ}$ (Feilotter et al., 1994)
- Y187: Mat α , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ , met⁻, gal80 Δ , URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ (Harper et al., 1993)

Als Standardmedium für die Anzucht von Hefezellen wurde YPD-Medium eingesetzt:

- 10 g Hefeextrakt
- 20 g Pepton
- auf 950 ml mit H₂O
- Zugabe von 50 ml autoklavierter, 40%iger Glucose

Für YPD-Agar-Platten wurde das Medium vor der Zugabe der Glucose mit 2% (w/v) Agar-Agar versetzt.

Alle weiteren Medien für die Versuche des *Yeast two-hybrid* Systems wurden dem Herstellerprotokoll des „Matchmaker two-hybrid System“ entnommen.

1.4 Tierische Zellkulturzellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Zelllinien verwendet:

HeLa	ATCC CCL-2; epithelartige Adenocarcinoma-Zellen, Mensch, Gebärmutter (Gossen and Bujard, 1992)
PtK ₂	ATCC CCL-56; Nierenepithelzellen der Beutelratte (<i>Potorous tridactylis</i>) (Walen, 1965; Walen and Braun, 1965)
C2C12	ATCC CRL-1772; Myoblasten Zellen der Maus (Blau et al., 1985; Yaffe and Saxel, 1977)
Cos-7	ATCC CRL-1651; SV40 transformiert; <i>african green monkey kidney</i> (Gluzman, 1981)

Die Zellen wurden in Zellkulturgefäßen der Firma Nunc (Nunc, Wiesbaden-Biebrich) in *Dubblecco's Modified Eagle Medium*, supplementiert mit 10% Fötalem Kälberserum (FCS), bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert.

Das Medium setzte sich wie folgt zusammen:

- 13,38 g DMEM (PAA Laboratories, Cölbe)
- 1,5 g NaHCO₃
- 10 ml 0,2M N-Acetyl-L-Alanin-L-Glutamin (PAA Laboratories)
- 100 ml FCS (Life Technologies)
- auf 1 l mit H₂O_{dest}

1.5 Vektoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Klonierung von PCR-Produkten die Vektoren pGEM[®]-T-Easy (Promega) und pCR[®]-blunt (Invitrogen) eingesetzt. Für die transiente Expression von Proteinen in tierischen Zellen wurden die Vektoren pcDNA3 (Invitrogen) pEGFP-C1 und pEGFP-C2 (Clontech) verwendet. Die zur Quantifizierung der Transfektionseffizienz eingesetzten Vektoren pCMV-nls-lacZ und pRSV-lacZ wurden freundlicherweise von Dr. Barbara Winter, die zur Untersuchung der Interaktion zwischen Profilin und PKC α eingesetzten PKC α -Fragmente wurden von Dr. Wolfgang Ziegler und Bettina Koch zur Verfügung gestellt. Für Luciferase-Assays wurde der Vektor pGL3-Promotor-Vektor (Promega) verwendet. *Yeast two-hybrid* Analysen wurden mittels der

Vektoren pGAD424, pGAD-T7, pGBT9 und pGBK-T7 (Clontech) durchgeführt. Die Expression von Proteinen in Prokaryoten erfolgte mittels der Vektoren pET28a(+) (Novagen) und pQE30 (Qiagen).

1.6 Oligodesoxynukleotide

Für die Konstruktion von Vektoren mit N- oder C-terminalen Birkenprofilin-tag (BiPro), das den Nachweis der entsprechenden Proteine mit dem spezifischen Antikörper 4A6 ermöglicht, wurden Oligodesoxynukleotide, die unter Berücksichtigung des Leserasters der cDNA Start- bzw. Stoppkodons enthalten, eingesetzt:

BiProM1: 5'- GCCTCCTTCCCACAGTTTAAGCCTCAGGAAATATAGC -3'

BiProM2: 5'-CTCGAGCTAAATTTCTGAGGCTTAAACTGTGGGAAGGAGGCTGCAG-3'

BiProM3: 5'- AGCTTAATGTCCTTCCCACAGTTTAAGCCTCAGGAAATCCCTGCA -3'

BiProM4: 5'- GGGATTTCTGAGGCTTAAACTGTGGGAAGGACATTA-3'

BiProM5: 5'- CTCCTTCCCACAGTTTAAGCCTCAGGAAATATAGC-3'

BiProM6: 5'- CTCGAGCTATATTTCTGAGGCTTAAACTGTGGGAAGGAGAGCT-3'

BiProM7: 5'- AGCTTAATGTCCTTCCCACAGTTTAAGCCTCAGGAAATCGAGCT-3'

BiProM8: 5'- CGATTTCTGAGGCTTAAACTGTGGGAAGGACATTA-3'

BiPro17: 5'- AATTCATGTCCTTCCCACAGTTTAAGCCTCAGGAAATCAC -3'

BiPro18: 5'- CATGGTGATTTCTGAGGCTTAAACTGTGGGAAGGACATG-3'

Das durch diese Oligodesoxynukleotide entstehende DNA-Fragment kodiert für die Aminosäuresequenz NSFPQFKPQEI, die das Epitop des monoklonalen, anti-Birkenprofilin Antikörpers 4A6 (siehe 1.7) repräsentiert (Rudiger et al., 1997; Wiedemann et al., 1996).

Die Konstruktion von Expressionsvektoren mit N-terminalem Flag-tag, das die Detektion entsprechender Fusionsproteine durch den monoklonalen anti-Flag Antikörper M2 (Sigma) ermöglicht, erfolgte unter Berücksichtigung des Leserasters mit folgenden Oligodesoxynukleotiden:

BamHI-N-Flag: 5'- GATCCATGGACTACAAGGACGACGACAAGG-3'

EcoRI-N-Flag: 5'- AATTCCTTGTCGTCGTCCTTGTAGTCCATG-3'

Die *electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) wurden mit folgenden Oligodesoxynukleotiden durchgeführt:

mreA-s: 5'-GGTCGATCGACACATTATAACGGTTTTTTAGC-3'

mreA-as: 5'-GGGCTAAAAAACCGTTATAATGTGTGTCGATCGA-3'

OHL34/35-s: 5'-GGCTAGAATTGACAGTTAATAGCAGTTAATTTT-3'

OHL34/35-as: 5'-GGAAAATTAAGTCTATTAACAGTCAATTCTAG-3'

Zur Konstruktion der Reporterplasmide pGL3-mreA-Luciferase bzw. pGL3-OHL34/35-Luciferase wurden die angeführten Oligodesoxynukleotide eingesetzt:

mreA-s-Kpn/Xho,Sal: 5'-CGCTCGAGATCGACACATTATAACGGTTTTTTAGCG-3'

mreA-as: 5'-TCGACGCTAAAAAACCGTTATAATGTGTGTCGATCTCGAGCGGTAC-3'

Howe-s-Kpn/XhoSal: 5'-CGTGCTCGAGCTAGAATTGACAGTTAATAGCAGTTAATTTTG-3'

Howe-as: 5'-TCGACAAAATTAAGTCTATTAAGTGTCAATTCTAGCTCGAGCACGGTAC-3'

Site directed mutagenesis wurden mit folgenden Oligodesoxynukleotiden durchgeführt:

POP T273E-s: 5'-GGGAGCTGGCTGGCGAGCTTCGGCAGGGACTGGC-3'

POP T273E-as: 5'-GCCAGTCCCTGCCGAAGCTCGCCAGCCAGCTCCC-3'

POP T273V-s: 5'-GGGAGCTGGCTGGCGTCCTTCGGCAGGGACTGGC-3'

POP T273V-as: 5'-GCCAGTCCCTGCCGAAGGACGCCAGCCAGCTCCC-3'

POP L281P-s: 5'-GGCAGGGACTGGCCAAACCGAGCGAGGCCCTCAGTGCC-3'

POP L281P-as: 5'-GGCACTGAGGGCCTCGCTCGGTTTGGCCAGTCCCTGCC-3'

POP L281A-s: 5'-GGCAGGGACTGGCCAAAGCGAGCGAGGCCCTCAGTGCC-3'

POP L281A-as: 5'-GGCACTGAGGGCCTCGCTCGCTTTGGCCAGTCCCTGCC-3'

POP L274P-s: 5'-GGGAGCTGGCTGGCACCCCTCGGCAGGGACTGGCCAA-3'

POP L274P-as: 5'-TTGGCCAGTCCCTGCCGAGGGGTGCCAGCCAGCTCCC-3'

POP L274A-s: 5'-GGGAGCTGGCTGGCACCGCTCGGCAGGGACTGGCCAA-3'

POP L274A-as: 5'-TTGGCCAGTCCCTGCCGAGCGGTGCCAGCCAGCTCCC-3'

POP T91A-s: 5'-GGAACGACTTCAAGCGCCGCGCCAAGGAGAAGCTGGCC-3'

POP T91A-as: 5'-GGCCAGCTTCTCCTTGGCGCGGCGCTTGAAGTCGTTCC-3'

POP T91E-s: 5'-GGAACGACTTCAAGCGCCGCGAGAAGGAGAAGCTGGCC-3'

POP T91E-as: 5'-GGCCAGCTTCTCCTTCTCGCGGCGCTTGAAGTCGTTCC-3'

POP RR/EE-s: 5'-GTTGGAACGACTTCAAGGAGGAGACCAAGGAGAAGCTGG-3'

POP RR/EE-as: 5'-CCAGCTTCTCCTTGGTCTCCTCCTTGAAGTCGTTCCAAC-3'

Die Amplifikation eines N- bzw. C-terminalen p42POP-Fragmentes erfolgte, entsprechend der cDNA-Sequenz, mit folgenden Oligodesoxynukleotiden:

POP 17: 5'- GAATTCGCCATGGCCTCGGCGACCGCG -3'

POP 170 XhoI: 5'- CTCGAGTCATGCCCCTCGATCCTGTGCGG -3'

POP 171 EcoRI: 5'- GAATTCATGGATACACCAGCCCAGAGCAAGGG -3'

POP 393 XhoI: 5'- CTCGAGTCACGGAGACTTCCAGCGGCCCC -3'

1.7 Antikörper

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Antikörper sind in den Tabellen 1 und 2 aufgeführt.

Tab. 1: Eingesetzte Primärantikörper:

Antikörper	Antigen	Typisierung	Hersteller
4A6	Birkenprofilin	mAK Maus	AG Jockusch
anti-Flag M2	Flag-tag	mAK Maus	Eastman Kodak
2H11	Rinderprofilin	mAK Maus	AG Jockusch
4D3	Δ POP1	mAK Maus	AG Jockusch
anti-POP	Δ POP1	pAK Kaninchen	Bioscience, Göttingen
anti-Profilin	Rinderprofilin	pAK Kaninchen	AG Jockusch

Tab. 2: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper:

Antikörper	Antigen	Hersteller
anti-Maus-HRP	Maus IgG	Dianova/Sigma
anti-Maus-AP	Maus IgG	Dianova/Sigma
anti-Kaninchen-HRP	Kaninchen IgG	Dianova/Sigma
Ziege anti-Maus-TRITC	Maus IgG	Dianova
Ziege anti-Maus-FITC	Maus IgG	Dianova
Ziege anti-Kaninchen-TRITC	Kaninchen IgG	Dianova
Ziege anti- Kaninchen -FITC	Kaninchen IgG	Dianova

1.8 Geräte

UV-VIS Spektrophotometer UV 1202, Shimadzu, Duisburg

Kühlzentrifuge J2-MC, Beckmann, München

Kühlzentrifuge 3K15, Sigma, Osterode am Harz

Tischzentrifuge Biofuge 13, Heraeus, Hanau

Tischzentrifuge 113, Sigma, Osterode am Harz

Peltier Thermal Cycler PTC 200, MJ Research, Watertown, Massachusetts, USA

ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer, PE Applied Biosystems GmbH, Weiterstedt

Geldokumentationsanlage incl. Software E.A.S.Y. RH, Herolab GmbH, Wiesloch

Video Copy Prozessor P68E, Mitsubishi Electric Cooperation

Transilluminator, Biometra, Göttingen

Heizblock DRI-Block DB-2A, Techne

Heizrührer RCTbasic, IKA Labortechnik, Staufen

Eppendorf Thermomixer 5436, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Vortex Genie 2™, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz

Agarose Gelelektrophoreseapparatur Nautiko 810, Labortechnik Fröbel, Lindau

Electrophoresis Power Supply Consort E455 und E734, Labortechnik Fröbel, Lindau

Rundschüttel-Inkubator, B.Braun, Melsungen

Fluoreszenzmikroskop Axiophot, Zeiss Germany

Micro Max, Princeton Instruments

Lichtmikroskop Telaval 31, Zeiss Germany

Fastblot B44, Biometra, Göttingen

Inkubator Steri-Cult200, Forma Scientific, Ohio, USA

Inkubator Certomat, Braun, Biotech International

Cell Disruptor B-12, Branson Sonic Power Co., Danbury, Connecticut, USA

ELISA-Reader, MRX, Dynatech Lab.

2 Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Die Aufnahme von Plasmid-DNA in Bakterien wird durch eine spezielle Behandlung der Bakterien, wodurch diese „kompetent“ gemacht werden, bewirkt.

Dazu wurden 100 ml LB-Medium mit einer üN-Kultur des entsprechenden *E.coli*-Stammes in einem Verhältnis von 1/50 angeimpft und bis zur logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600nm} \approx 0,5-0,6$) bei 37°C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 5min auf Eis gestellt und bei 4°C bei 5000 xg für 5 min abzentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien wurden in eiskaltem TFB I (0.3 M Natriumacetat pH 5.8, 50 mM $MnCl_2$, 100 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2$, 15% Glycerin) resuspendiert, die Suspension 10 min auf Eis inkubiert und wie oben zentrifugiert. Die kompetenten Bakterien wurden in 2 ml eiskaltem TFB II (100 mM MOPS pH 7, 75 mM $CaCl_2$, 10mM NaCl, 15% Glycerin) aufgenommen und in Aliquots à 400 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Bakterien wurden bei -80°C gelagert.

2.1.2 Transformation von Bakterien

Bei der Transformation wurden 200 µl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und 10-500 ng Plasmid-DNA oder 5-7 µl des Ligationsansatzes zugegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 s, der die Aufnahme der DNA in die Bakterienzelle unterstützt. Nach Abkühlen des Transformationsansatzes auf Eis für 1 min wurde 0.7 ml LB-Medium zugegeben und 45 min bei 37°C inkubiert, um die Expression der Restistenzgene (β -Lactamase, Phosphotransferase etc.) zu ermöglichen. 100 und 200 µl des Ansatzes wurden auf Antibiotika-haltigen LB-Agar-Platten ausplattiert und bei 37°C üN inkubiert.

2.1.3 RNA-Präparation

Die Präparation der Gesamt-RNA aus tierischen Zellen oder verschiedenen Mausgeweben erfolgte mit dem *RNeasy Mini Kit* der Firma Qiagen.

Die Zellen wurden durch Scherung unter denaturierender Bedingung lysiert. Die Isolierung der RNA erfolgte basierend auf selektiven Bindungseigenschaften der eingesetzten Silicagel-ähnlichen Membran entsprechend den Herstellerangaben.

2.1.4 Plasmidpräparation

2.1.4.1 TELT-Methode

Eine 1,5 ml *E. coli*- Übernachtskultur wurde 5min bei 6000 xg zentrifugiert und das Bakteriensediment in 150 µl TELT-Puffer (50 mM Tris/Cl pH 7.5, 62.5 mM EDTA pH 8.0, 0.4% Triton X-100, 2.5 M LiCl) resuspendiert und durch Zugabe von 15 µl Lysozym (10 mg/ml) 5min bei RT lysiert. Anschließend wurden die Proteine durch Erhitzen auf 95°C für 2min denaturiert und auf Eis für 5min abgekühlt. Nach Zentrifugation bei 13000 xg für 8min wurden die sedimentierten Zellbestandteilen mit einem sterilen Zahnstocher entnommen und 100 µl Isopropanol zugegeben. Die Präzipitation der Plasmid-DNA erfolgte durch eine 15minütige Zentrifugation bei 13000 xg. Das DNA-Pellet wurde mit 100 µl 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE mit 1 µl RNase A (1 mg/ml) aufgenommen.

2.1.4.2 Alkalische Lyse

1.5 ml *E. coli*-Übernachtskultur wurden bei 6000 xg für 5min sedimentiert und das Bakteriensediment in 350 µl P1 (50 mM Tris/Cl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A; pH8.0) resuspendiert. Durch Zugabe von 350 µl P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) und Durchmischen der Suspension durch Invertieren erfolgte die Lyse der Bakterien. Nach Neutralisation durch 350 µl P3 (3 M K-Acetat, pH5.5) erfolgte eine Präzipitation denaturierter Proteine und genomischer DNA durch Zentrifugation bei 15000 xg für 15min. Der Überstand wurde erneut für 5min zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 0.7 Volumen Isopropanol gefällt und für 30min bei 15000 xg präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70%

Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl H₂O resuspendiert. Die DNA konnte ohne weitere Aufarbeitung direkt für die Sequenzierung eingesetzt werden.

2.1.4.3 Plasmidpräparation mit *Qiagen Plasmid Kits*

Die Präparation von Plasmid-DNA mit dem *Qiagen Plasmid Kit* (Qiagen, Hilden) wird über eine Anionenaustauscherchromatographie durchgeführt. Ein spezielles hydrophiles Trägermaterial gewährleistet durch sein Ausschlußvolumen von ca. 100 µm und eine hohe Oberflächendichte von DEAE-Gruppen eine Trennung der Plasmid-DNA von Proteinen und Polysacchariden.

Die Durchführung der Plasmidpräparation erfolgte nach den Angaben des „Qiagen Plasmid Handbook“.

2.1.5 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und der Grad der Verunreinigung durch Proteine oder Phenol wurde spektrophotometrisch durchgeführt.

Dabei wurde die Absorption der Nukleinsäure-Lösung gegen Wasser bei 260 nm (Absorption der Purin- und Pyrimidinbasen) gemessen. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine Absorption von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml, für ssDNA und RNA 40 µg/ml. Der Grad der Verunreinigung wird über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm (Absorption der Peptidbindung und Phenol) bestimmt. Der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} sollte zwischen 1.8 und 2.0 liegen; durch Verunreinigungen wird der Quotient zu kleineren Werten verschoben.

2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

2.1.6.1 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

Um eine Auftrennung der RNA gemäß ihres Molekulargewichtes zu gewährleisten und Einflüsse der Sekundärstruktur auf das Laufverhalten zu vermeiden, wurde eine denaturierende Gelelektrophorese durchgeführt. Für ein 10 x 7.5cm Gel wurde 0.3 g (1% w/v) Agarose in 3 ml 10x MOPS/EDTA-Puffer (0.2 M MOPS pH7.0, 10 mM EDTA, 50 mM Na-

Acetat) und 26.5 ml DEPC-H₂O geschmolzen und nach Abkühlung auf 50°C 1.5 ml 37% Formaldehyd zugegeben.

2 µg RNA wurden mit Probenpuffer (0.75 ml Formamid, 0.24 ml Formaldehyd, 0.1 ml H₂O, 0.1 ml Glycerin, 0.08 ml 10% Bromphenolblau, 0.15 ml 10x MOPS/EDTA-Puffer) auf 10 µl aufgefüllt, 15min bei 65°C denaturiert und mit 0.8 µl Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/ml) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei RT und einer Spannung von 100V.

2.1.6.2 DNA-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente werden gemäß ihrer Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Dazu wurden entsprechend der erwarteten Länge der DNA-Fragmente Agarosegele unterschiedlicher Konzentration in 1xTBE (89 mM Tris/Cl, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA) eingesetzt. Die DNA-Fragmente wurden mittels des interkalierenden und fluoreszierenden Ethidiumbromids, das dem Gel direkt zugesetzt wurde, unter UV-Licht nachgewiesen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120V.

2.1.7 Herstellung eines DNA-Längenmarkers

Bei der DNA-Gelelektrophorese diente die mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* hydrolysierte DNA des Bakteriophagen λ als Längenmarker. Die Größen der bei der Hydrolyse entstehenden DNA-Fragmente sind in Tabelle 3 aufgeführt. Gleichzeitig ermöglichen die λ-DNA-Fragmente eine Mengenabschätzung der aufgetrennten Plasmid-DNA-Fragmente.

Tab. 3: DNA-Fragmentlänge und Konzentration des λ-*EcoRI-HindIII*-Markers

Fragmentlänge	DNA-Konzentration in ng/5µl
21800 bp	278
5240, 5050 bp	67, 64
4210 bp	54
3410 bp	44
1980, 1900 bp	25, 24
1570 bp	20
1320 bp	17
930 bp	12
840 bp	11
580 bp	8
130 bp	2

2.1.8 DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen

Mittels Mg^{2+} -abhängiger Restriktionsendonukleasen des Typs II können DNA-Fragmente an spezifischen, palindromischen Sequenzen gespalten werden. Dabei werden Phosphodiesterbrücken der Nukleinsäuren hydrolysiert, wobei in Abhängigkeit des verwendeten Enzyms entweder *sticky* oder *blunt ends* entstehen. Die Reaktionsbedingungen (Temperatur, Pufferzusammensetzung, Inkubationszeit) wurden je nach Enzym entsprechend den Vorschriften des Herstellers eingestellt.

2.1.9 Phenol-Extraktion

Um störende und verunreinigende Proteine aus einer DNA-Lösung zu entfernen, wurde diese mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt. Dabei dient die organische Phase als Lösungsmittel für die Proteine. Nach vollständiger Phasentrennung - durch 1minütige Zentrifugation bei 13000 xg - reichern sich die Proteine in der Interphase zwischen der wässrigen und organischen Phase an. Um eventuelle Verunreinigungen der wässrigen Phase durch Phenol zu entfernen, wurde die wässrige Phase mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol gemischt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die wässrige, DNA-haltige Phase abgenommen und die DNA mit Ethanol präzipitiert (siehe 2.1.10).

2.1.10 Alkohol-Präzipitation von DNA

Zur Konzentrierung von DNA-Lösungen wurden diese mit Alkohol (100% Ethanol oder Isopropanol) und monovalenten Kationen (in Form von Na-Acetat) versetzt. Unter diesen Bedingungen kommt es zur Aggregation der DNA-Moleküle und ihrer Präzipitation als Natriumsalz, wogegen kurze DNA-Fragmente in Lösung bleiben.

Die DNA-Lösung wurde mit einem 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat (pH5.4) und 2.5 Vol. 100% Ethanol oder 0.7 Vol. Isopropanol (-20°C) versetzt, durchmischt und 1h bei -80°C gefällt. Durch Zentrifugation bei 13000 xg wurde die DNA sedimentiert und das Präzipitat mit 70%igem Ethanol (-20°C) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (10min, 13000 xg) wurde das Sediment in einem geeigneten Volumen TE-Puffer oder H₂O resuspendiert.

2.1.11 Polyethylenglycol (PEG)-Präzipitation

Zur Aufarbeitung von TELT-Plasmidpräparationen für Sequenzierungsreaktionen wurde die DNA einer PEG-Fällung unterzogen. Dazu wurde die DNA-Lösung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 100 μl aufgefüllt, mit 30% PEG-3350 in 1.6 M NaCl versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die so ausgefällte DNA wurde 30min bei 14000 xg bei 4°C präzipitiert und das DNA-Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die DNA getrocknet und in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufgenommen.

2.1.12 DNA-Fragment-Isolierung

Die Isolierung spezifischer DNA-Fragmente aus präparativen Agarosegelen erfolgte durch die Bindung der negativ geladenen DNA an Glaspulver und anschließender Elution. Dazu wurde der „QIA[®]EXII Gel Extraction Kit“ (Qiagen) eingesetzt. Das zu isolierende DNA-Fragment wurde aus dem Agarosegel geschnitten und entsprechend den Herstellerangaben behandelt.

2.1.13 Dephosphorylierung von 5'-Phosphatenden

Um die Rezirkularisierung eines nur mit einem Restriktionsenzym hydrolysierten Vektors zu verhindern, wurden die endständigen 5'-Phosphatgruppen durch eine Phosphatase-Behandlung entfernt. Da die T4-DNA-Ligase aktivierte 5'-Enden zum katalytischen Angriff auf die 3'-OH-Gruppen benötigt, wird somit eine Rezirkularisierung unterbunden.

Nach vollständiger Hydrolyse des Vektors durch das entsprechende Restriktionsenzym und anschließender Gel-Elution, wurde der linearisierte Vektor mittels der *shrimp alkaline phosphatase* (Boehringer) entsprechend den Herstellerangaben dephosphoryliert. Die präparierte Vektor-DNA konnte direkt zur Insertion von DNA-Fragmenten eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden.

2.1.14 *In vitro* -Neukombination von DNA-Fragmenten

Durch DNA-Ligasen wird die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen zwei DNA-Fragmenten katalysiert. Als Cofaktoren werden bei eukaryotischen DNA-Ligasen ATP, bei prokaryotischen NAD zur Ausbildung einer kovalente Bindung zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-OH-Gruppe benötigt.

Die Ligation wurde in 15µl-Ansätzen durchgeführt (1.5µl 10x Appligene-Ligase-Puffer, 2.5U T4-DNA-Ligase, Insert und Vektor in einem Verhältnis von ca. 3:1) und über Nacht bei 15°C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde ohne weitere Behandlung für die Transformation von Bakterien eingesetzt.

2.1.15 Reverse Transkription

Durch reverse Transkriptasen - RNA-abhängige DNA-Polymerasen - wird nach Zugabe eines entsprechenden Primers der zur RNA komplementäre DNA-Strang synthetisiert.

Dazu wurden 2µg der RNA mit H₂O auf 10µl aufgefüllt und mit 1.5µl des entsprechenden Primers versetzt. Durch Erhitzen des Ansatzes auf 65°C für 5min werden Sekundärstrukturen innerhalb der RNA aufgelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5x reverse Transkriptase-Puffer, 2µl 10mM dNTP-Mix, 0,2 µl BSA (1mg/ml), 2µl reverse Transkriptase und 0,7µl RNasin (20U/µl) gestartet. Nach einer Inkubation bei 37°C für 1h erfolgte die Denaturierung der reversen Transkriptase bei 95°C für 5min.

2.1.16 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion wird eine exponentielle Amplifikation eines spezifischen DNA-Fragmentes mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase durch zyklische Wiederholung von Hitzedenaturierung, Primerhybridisierung (Annealing) und DNA-Synthese erreicht. Durch das exponentielle Ansteigen der DNA-Menge erhält man selbst aus geringen Mengen Ausgangsmaterial eine quantitative Menge der gewünschten DNA-Sequenz. Durch Einführung von Erkennungssequenzen verschiedener Restriktionsenzyme bietet diese Methode die Möglichkeit, spezifische cDNA-Bereiche zu amplifizieren und in definierter Orientierung zu klonieren. Für analytische Zwecke wurde die Taq-DNA-Polymerase (Takara,

Appligene) aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* eingesetzt, die über keine 3'→5'-Exonukleaseaktivität verfügt und entsprechend eine erhöhte Fehlerrate während der Synthese aufweist. Wurde auf eine geringere Fehlerrate Wert gelegt, erfolgte die Amplifikation mit der Tli-DNA-Polymerase (Promega), die über eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität verfügt.

Die Qualität der PCR wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft und die entsprechende Bande quantitativ durch eine Fragment-Isolierung präpariert.

2.1.17 Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Fragmente wurden zur Subklonierung in spezielle Vektoren, die eine hohe Effizienz für rekombinante Klone gewährleisten, inseriert. Die Ligation und Transformation erfolgte bei beiden Systemen entsprechend den Herstellerangaben.

2.1.17.1 pGEM[®]-T-Easy Vektor

Taq-DNA-Polymerasen haben eine Transferase-Aktivität, die an 3'-Enden von PCR-Produkten unspezifisch Nukleotide (meist Desoxyadenosin) anhängt. Der linearisierte pGEM[®]-T-Easy Vektor besitzt überhängende 3'-Desoxythymidine, wodurch ein schnelles, direktes Klonieren möglich ist. Erfolgte die PCR-Reaktion mit einer Polymerase, die über eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität verfügt, wurden dem PCR-Produkt nachträglich ein Adenosin angehängt. Dazu wurde der PCR-Ansatz für 10min bei 72°C mit einer Taq-DNA-Polymerase inkubiert. Anschließend wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation durchgeführt

2.1.17.2 Zero Blunt[™] PCR Cloning Kit

Durch die Ligation von *blunt end* PCR-Fragmenten in den linearisierten pCR[®] blunt Vektor wird das letale *E. coli* Gen *ccdB* zerstört, so dass nur rekombinante Klone nach der Transformation wachsen können.

2.1.18 Ortsspezifische Mutagenese

Für die gezielte Mutagenese bestimmter Aminosäuren wurde der *QuikChangeTM site-directed mutagenesis kit* (Stratagene) eingesetzt. Dieser ermöglicht über entsprechende Oligodesoxynukleotide, die die gewünschte Mutation enthalten, mittels PCR einen ortsgerichteten Nukleotidaustausch in der cDNA. Durch einen anschließenden *DpnI* Verdau kann die parentale, methylierte Plasmid-DNA spezifisch verdaut werden, so dass für die Transformation ausschließlich neu synthetisierte, nicht methylierte DNA eingesetzt wird. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

2.1.19 Southern Blot

Zur Identifizierung und Verifizierung können DNA-Fragmente nach Auftrennung im Agarosegel als einzelsträngige DNA auf Membranen transferiert werden (Southern, 1975). Dazu wurde das Gel nach der Elektrophorese in einer Vakuum-Blot-Apparatur (Fröbel, Wasserburg) auf eine positiv geladene Nylonmembran (HybondN, Amersham Pharmacia) platziert und ein Vakuum von 100 – 150mbar angelegt. DNA-Fragmenten über 10kb wurden durch 250mM HCl für 5min depuriniert. Die Denaturierung der DNA erfolgte durch Übersichten des Gels mit 0.5M NaOH, 1.5 M NaCl für 10min. Anschließend wurde die DNA mit 0.5M Tris/Cl pH7.5, 1.5M NaCl für 10min neutralisiert und für weitere 45min mit 20x SSC (3M NaCl, 0.3M Na-Citrat; pH7.0) transferiert. Abschließend wurde die DNA auf der Membran durch UV-Bestrahlung (0.3 Joule/cm²) immobilisiert und konnte für Hybridisierung und Detektion eingesetzt werden.

2.1.20 Nichtradioaktive Markierung von DNA

Die Markierung von DNA zur Generierung spezifischer Sonden erfolgte durch den Einbau des Nukleotidanalogs Digoxigenin-11-Desoxyuridinphosphat (Dig-11dUTP) im Zuge einer PCR. Dafür wurde das gewünschte DNA-Fragment zunächst via PCR amplifiziert und mittels des *QIA[®]EXII Gel Extraction Kits* aus dem Gel eluiert. 1 – 5µl wurden anschließend in einem 25µl PCR-Ansatz, in dem der Dig-11dUTP-labeling Mix (Boehringer) eingesetzt wurde,

amplifiziert. Der Einbau von Dig-11dUTP konnte gelelektrophoretisch durch das veränderte Laufverhalten überprüft werden. Die Sonde wurde anschließend bei -20°C aufbewahrt.

2.1.21 Hybridisierung und Nachweis Dig-11dUTP-markierter Sonden

Durch Hybridisierung einzelsträngiger, immobilisierter DNA mit spezifischen DNA-Sonden können komplementäre DNA-Bereiche identifiziert werden. Dazu wurden Dig-11dUTP-markierte DNA-Sonden eingesetzt. Die Durchführung erfolgte analog dem „DIG User's Manual“ der Firma Boehringer-Mannheim.

2.1.22 Radioaktive Markierung doppelsträngiger Oligodesoxynukleotide

Zur radioaktiven Markierung wurden doppelsträngige Oligodesoxynukleotide mit 5' überhängenden Guanidinresten eingesetzt. Einbau von $[^{32}\text{P}]\text{-}\alpha\text{CTP}$ wurde mittels der Klenow-Polymerase (Appligene) durchgeführt. Dafür wurden 100pmol doppelsträngige Oligodesoxynukleotide, 2µl 10x Klenow-Puffer, 2µl dNTP (je 5mM; ohne dCTP), 5µl $[^{32}\text{P}]\text{-}\alpha\text{CTP}$ (3000Ci/mmol), 2µl Klenow-Polymerase in einem Endvolumen von 20µl für 20min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1µl 0.5M EDTA gestoppt und bei -20°C gelagert. Die Abtrennung nicht eingebauter radioaktiver Nukleotide und die Reinigung der doppelsträngigen Oligodesoxynukleotide erfolgte über Sephadex G-25 NAP-5-Säulen (Pharmacia) entsprechend den Herstellerangaben.

2.1.23 Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung

Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung wurde mit dem *AmpliTa[®] FS BigDye Terminator Kit* der Firma PE AppliedBiosystems gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktion beruht auf dem Kettenabbruchverfahren von Sanger (Sanger et al., 1977), bei dem der zu sequenzierende DNA-Strang mittels einer DNA-Polymerase vom 3'-Ende eines Sequenzierungsoligodesoxynukleotids kopiert wird. Durch im Reaktionsansatz vorhandene, fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide wird die DNA-Synthese basenspezifisch terminiert.

Für die PCR-Sequenzreaktion wurden 5pmol Sequenzierungsprimer, 0.3µg dsDNS und 2µl Premix in einem Gesamtvolumen von 10µl eingesetzt. Nicht eingebaute fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide wurden durch Ethanolpräzipitation entfernt, das getrocknete DNA-Sediment in 13µl TSR (Template Supression Reagent, PE AppliedBiosystems) aufgenommen und für 2min bei 90°C denaturiert.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte durch Kapillarelektrophorese mit dem ABI PrismTM 310 Genetic Analyzer nach Herstellerangaben.

2.2 Biochemische Methoden

2.2.1 Expression in *E. coli* und Zellschnellaufschluß

Die für die Expression rekombinanter Proteine verantwortlichen Promotoren der Vektoren pQE30 und pET28b(+) sind durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1mM) induzierbar. Dies führt zur Transkription und somit zur Translation eines „downstream“ liegenden, Protein-kodierenden DNA-Fragments.

Nach Induktion der Transkription wurde eine Expressionskinetik erstellt. Die dafür entnommenen Proben wurden entsprechend ihrer optischen Dichte bei 600nm nach Zentrifugation mit SDS-Probenpuffer versetzt ($OD_{600}=1 \propto 0,1\text{ml Probenpuffer}$) und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.2 Expression und Reinigung von rekombinantem Maus Profilin I und IIa

Die Reinigung der rekombinanten Maus Profilin-Isoformen erfolgte durch Affinitätschromatographie mit poly-L-Prolin (Tanaka and Shibata, 1985).

2.2.2.1 Herstellung von poly-L-Prolin-Sepharose

Poly-L-Prolin wurde an Cyanbromid-aktivierte Sepharose CL-4B (Amersham-Pharmacia, Freiburg) gekoppelt. Vor der Kopplungsreaktion wurde die Sepharose in 1 mM HCl gequollen, gewaschen und in Kopplungspuffer (0,2 M NaCl, 0,1 M NaHCO₃; pH 9,0) mit

poly-L-Prolin bei 4°C unter Bewegung inkubiert. Die Absättigung freier reaktiver Cyanbromid-Gruppen erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Abschließend wurde die poly-L-Prolin-Sepharose in 0,1M Tris/Cl (pH 8,0), 0,5 M NaCl und 2 mM NaN₃ überführt und bei 4°C gelagert.

2.2.2.2 Expression und Reinigung

Maus Profilin I und IIa cDNA wurde mittels der prokaryotischen Expressionsvektoren pET28a(+) bzw. pMW172 im *E.coli* Stamm BL21 (DE3) exprimiert. 1 l *E.coli* Kulturen wurden in 2xYT Medium unter entsprechendem Antibiotikumselektionsdruck bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 bei 37°C inkubiert. Nach Induktion der Expression mit 1 mM IPTG wurden die Bakterien nach Inkubation für weitere 3 h sedimentiert (6500 x g, 15 min, 4°C), in 25ml Lysispuffer (20 mM Tris/Cl, 150mM NaCl, 10mM EGTA, 20 mg Lysozym, 50µm Pefabloc SC, 0,46µM Aprotinin; pH 7,6) aufgenommen und bei -80°C eingefroren. Nach Auftauen der Zellsuspension wurden die Bakterien durch Ultraschall (3 x 45 s mit 30 s Pause, 50 – 80 V) vollständig aufgeschlossen. Die Zellfragmente wurden bei 4°C für 45 min bei 30000 x g abzentrifugiert und der Überstand auf eine mit Lysispuffer äquilibrierte poly-L-Prolin-Sepharose Säule mit einer Flußrate von 30 ml/h gegeben. Die Säule wurde mit ca. 5 Säulenvolumen Waschpuffer I (20 mM Tris/Cl, 150mM NaCl; pH 7,6) und 10 Säulenvolumen Waschpuffer II (20mM Tris/Cl, 150mM NaCl, 2M Harnstoff; pH 7,6) gewaschen. Beide Profilin Isoformen wurden unter denaturierenden Bedingungen (20mM Tris/Cl, 150mM NaCl, 6M Harnstoff; pH 7,6) eluiert. Proteinhaltige Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und Profilin-haltige Fraktionen vereinigt. Renaturierung der Profileine erfolgte durch Dialyse gegen Puffer (20mM Tris/Cl, 0,2mM CaCl₂, 14mM β-Mercaptoethanol) mit abnehmenden Harnstoff-Konzentrationen. Die Profilin-Suspensionen wurden sterilfiltriert und mit 50% Glycerin versetzt bei -20°C gelagert.

2.2.3 Expression und Reinigung von rekombinanten p42POP-Fragmenten mit His-Tag

Die Aufreinigung von Wildtyp und mutierten p42POP-Fragmenten erfolgte durch Affinitätschromatographie, basierend auf der hohen Affinität des aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinen bestehenden His-tags an Ni²⁺-Ionen. Die Reinigung wurde in Anlehnung an das Herstellerprotokoll („The QIAexpressionist“, Qiagen) durchgeführt.

Der *E.coli* Stamm M15(pREP4) wurde mit den entsprechenden Konstrukten transformiert. Die Bakterien wurden in 2xYT Medium unter entsprechendem Selektionsdruck bei 30°C kultiviert und die Proteinexpression bei einer OD_{600nm} von 1 durch IPTG (Endkonzentration 1mM) induziert. Nach 3 h wurden die Bakterien bei 6500 xg sedimentiert, in 25 ml kaltem Lysispuffer (50mM Na-Phosphat, 300mM NaCl, 10mM Imidazol, 14mM β-Mercaptoethanol, 50µM Pefabloc SC, 0.46µM Aprotinin; pH 8.0) pro Liter Ausgangskultur resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Nach Auftauen bei 37°C wurden die Bakterien durch Ultraschallbehandlung auf Eis (3 x 45 sec, 80W) vollständig aufgeschlossen und Zelltrümmer bei 30000 xg bei 4°C für 30 min sedimentiert.

Der Überstand wurde mit in Lysispuffer äquilibrierter Ni-NTA-Sepharose für 1 h auf Eis inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden im Batchverfahren nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Eluiertes Protein wurde auf seine Reinheit durch SDS-PAGE überprüft, entsprechende Fraktionen vereinigt und durch Zentrifugalfiltration umgepuffert und ankonzentriert.

2.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Methode nach Bradford (1976) basiert auf der Reaktion der Proteine mit Coomassie Blau, die über einen großen Konzentrationsbereich linear zur eingesetzten Proteinmenge ist. Dabei entstehende Farbstoffkomplexe weisen ein Absorptionsmaximum bei 595nm auf (Bradford, 1976).

20µl Proteinlösung wurden in einer 96-Loch Platte mit 100µl Bradford-Reagenz (Sigma) versetzt und nach 15 minütiger Inkubation bei 595nm photometrisch mittels eines „ELISA-Readers“ vermessen. Die Proteinkonzentration wurde in Abhängigkeit einer Eichgeraden mit BSA (10 – 100µg/ml) bestimmt.

2.2.4.2 Proteinbestimmung über molare Extinktionskoeffizienten

Mittels molarer Extinktionskoeffizienten kann die Proteinkonzentration über das Lambert-Beersche-Gesetz ermittelt werden:

$$E = \epsilon * d * c$$

E: Extinktion bei 280nm ϵ : molarer Extinktionskoeffizient

d: Schichtdicke c: Konzentration

Für Maus Profilin I und IIa experimentell ermittelte Werte:

Profilin I: $OD_{280nm}=1 \cong 0.83\text{mg/ml}$ (Larsson & Lindberg, 1988)

$OD_{280nm}=1 \cong 0.90\text{mg/ml}$ (kalkulierter Extinktionskoeffizient)

Profilin IIa: $OD_{280nm}=1 \cong 0.71\text{mg/ml}$ (kalkulierter Extinktionskoeffizient)

2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden, reduzierenden Bedingungen proportional zu ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dafür wurden das Glycin-SDS-Polyacrylamid-Gelsystem nach Laemmli (Laemmli, 1970) eingesetzt. Die Proben wurden mit 5x Probenpuffer (375mM Tris/HCl pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 12% (v/v) Glycerin, 1.4M β -Mercaptoethanol, Bromphenolblau) versetzt und 5min bei 95°C denaturiert. Entsprechend der Molekulargewichte der zu analysierenden Proteine wurden diskontinuierliche Gele unterschiedlicher Polyacrylamid-Konzentration verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Stromstärke (25mA/Gel). Anschließend wurden die Gele entweder fixiert und gefärbt (15% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0.025% (w/v) Coomassie Blau), danach zur Verdeutlichung der Proteinbanden entfärbt (15% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure) oder für einen Immunblot (siehe 2.2.6) entsprechend weiterbehandelt. Als Größenstandards dienten die in Tabelle 4 aufgeführten „low molecular weight marker“ (LMW, Sigma), „high molecular weight marker“ (HMW, Sigma) oder „prestained marker“ der Firma NEB.

Tab. 4: Molekulargewichtszusammensetzung der eingesetzten Marker

LMW (in kDa)		HMW (in kDa)		prestained marker (in kDa)	
Rinderalbumin	66	Myosin	205	MBP- β -Galactosidase	175
Ovalbumin	45	β -Galactosidase	116	MBP-Paramyosin	83
GAPDH	36	Phosphorylase-B	97.5	Glutamatdehydrogenase	62
Carboanhydrase	29	Rinderalbumin	66	Aldolase	47.5
Trypsinogen	24	Ovalbumin	45	Triosephosphat Isomerase	32.5
Trypsin-Inhibitor	20.1	Carboanhydrase	29	β -Lactoglobulin A	25
α -Lactalbumin	14.2			Lysozym	16.5
				Aprotinin	6.5

2.2.6 Immunblot

Um Proteine spezifisch nachzuweisen, wurde der Immunblot (Westernblot) eingesetzt. Dabei werden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine durch Anlegen einer Spannung elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die Durchführung erfolgte analog den Herstellerangaben (Biometra). Freie Bindungsstelle der Nitrozellulosemembran wurden durch Inkubation für 1h bei RT oder üN bei 4°C mit 5% (w/v) Magermilchpulver in TBST (20mM Tris/HCl, 140mM NaCl, 0,02% Tween-20; pH7,6) abgesättigt. Nach Waschen mit TBST wurde die Membran mit dem ersten Antikörper in 2% (w/v) BSA in TBST für 1h bei RT inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch Waschen mit TBST entfernt, bevor der gegen den ersten Antikörper gerichtete Sekundär-Antikörper (alkalische Phosphatase- oder Meerrettichperoxidase-gekoppelt) in 2% (w/v) BSA in TBST für 1h bei Raumtemperatur zugegeben wurde. Nach Inkubation mit dem Zweitantikörper für 45min bei RT und anschließendem Waschen mit TBST + 1% Triton-X-100 erfolgte die Blotentwicklung.

Die Detektion des mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Antikörpers erfolgte nach Äquilibration in alkalischem Phosphatase-Puffer (100mM Tris/Cl pH 9.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂) durch Entwicklung des Blots mit 10 ml alkalischem Phosphatase-Puffer, 30 µl 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (50 mg/ml in DMF) und 60 µl Nitroblau-Tetrazolium (50 mg/ml in DMF). Durch Zugabe von H₂O wurde die enzymatische Reaktion beendet.

HRP-gekoppelte Sekundärantikörper wurden durch Chemilumineszenzreaktion detektiert. Dazu wurde der Blot mittels des *enhanced chemoluminescence*- (ECL) oder des empfindlicheren Super-ECL-Systems der Firma Amersham Pharmacia Biotech entwickelt. Dabei wird mit Hilfe der Peroxidase unter Lichtemission Luminol oxidiert. Das Licht wurde mittels Röntgenfilm (Kodak X-Omat, Amersham Pharmacia Biotech) nachgewiesen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2.7 Phosphorylierung von Profilin durch die Proteinkinase C α (PKC α)

Um den Einfluß einer potentiellen Regulation der Maus Profilin-Isoformen I und IIa durch Phosphorylierung zu untersuchen, wurde Profilin IIa in Anlehnung an die für Profilin I beschriebenen Bedingungen (Singh et al., 1996) auf mögliche PKC α Phosphorylierungsstellen untersucht.

100pmol Profilin wurden 30min bei 4°C unter verschiedenen Phospholipidbedingungen präinkubiert und anschließend für die Phosphorylierungsreaktion eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in 25µl Kinase-Puffer (20mM HEPES, 10mM MgCl₂, 0.5mM EGTA, 0.05% Triton-X-100, 200nM TPA, 0.063mM CaCl₂, 100µM ATP, 1µCi [³²P]-γATP, 30ng PKCα) und wurde durch Zugabe von 10µl SDS-PAGE-Probenpuffer gestoppt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie.

2.2.8 Phosphorylierung mittels der cAMP-abhängigen Serin/Threonin Proteinkinase (PKA)

Zur Identifizierung potentieller PKA Phosphorylierungsstellen wurden 100pmol unterschiedlicher Proteine mit der katalytischen Untereinheit der PKA bei 30°C inkubiert. Die Phosphorylierungsreaktion wurde in PKA-Phosphorylierungspuffer (10mM HEPES, 50mM KCl, 5mM MgCl₂, 1mM DTT, 0.2mM EGTA, 200µM ATP, 0.2µCi [³²P]-γATP) bei 30°C für unterschiedliche Zeiten inkubiert und durch Zugabe von 10µl SDS-PAGE-Probenpuffer gestoppt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE, Transfer auf Nitrozellulose mittels Semidry-Blot und anschließender Autoradiographie.

2.2.9 Chemical crosslinks mit NHS/EDC

Um Protein-Protein-Interaktionen qualitativ nachzuweisen, können die potentiellen Interaktionspartner mit dem chemischen *crosslinker* EDC/NHS inkubiert, Protein-Komplexe im SDS-PAA-Gel aufgetrennt und im Immunblot analysiert werden.

Dazu wurden 25-100pmol der zu testenden Proteine in einem Gesamtvolumen von 26.25µl bei 30°C für 30min präinkubiert. Anschließend wurde zur Quervernetzung 3.75µl eines NHS/EDC-Gemisches (100µl 44mg/ml N-Hydroxysulfosuccinimid, 25µl 1-Ethyl-3-(3-Dimethyl-Aminopropyl)-Carbodiimid; Pierce) zugesetzt. Nach 20 und 60min wurde die Reaktion durch Zugabe von 12.5µl SDS-PAGE-Probenpuffer gestoppt. Je 10µl Probe wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunblot analysiert.

2.2.10 Yeast two-hybrid System

Das *Yeast two-hybrid* System ermöglicht eine *in vivo* Identifizierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in Hefezellen. Dieser Assay basiert auf dem strukturellen Aufbau vieler eukaryotischer Transkriptionsfaktoren, der „räumlichen Trennung“ von DNA-bindenden und transkriptionsaktivierenden Domänen. Während die DNA-bindende Domäne die Bindung des Transkriptionsfaktors an stromaufwärts von dem entsprechenden Transkriptionsstartpunkt gelegene regulatorische DNA-Sequenzen ermöglicht, sind transkriptionsaktivierende Domänen für die Initiation der Transkription erforderlich. Da die funktionellen Eigenschaften auch bei einer physikalischen Trennung der beiden Domänen erhalten bleiben, lassen sich Interaktionen von Proteinen über die Rekonstitution des Transkriptionsfaktors nachweisen. Bei dem eingesetzten „Matchmaker two-hybrid System“ werden die beiden Domänen des Transkriptionsfaktors GAL4 als Fusionsproteine mit den zu untersuchenden Proteinen *in vivo* exprimiert. Treten Interaktionen zwischen den beiden Proteinen auf, wird der Transkriptionsfaktor GAL4 rekonstituiert und somit eine Transkription und Expression des Reportergens β -Galaktosidase ermöglicht. Die Detektion der β -Galaktosidase erfolgt über die Umsetzung der Substrate 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside (X-Gal) in einem β -Galaktosidase-Filterassay oder O-Nitrophenyl- β -D-Galactoside (ONPG) in Flüssigassays. Die Durchführung der Versuche (Transformation, Selektion, Medienzusammensetzung, β -Galaktosidase-Assays) erfolgte analog den Angaben des „Matchmaker two-hybrid System“ Protokolls (Clontech, Heidelberg).

2.2.11 *In vitro* Transkription und Translation zur radioaktiven Markierung von Polypeptiden

Zur Expression radioaktiv markierter Polypeptide wurde das gekoppelte *in vitro* Transkriptions/Translationssystem der Firma Promega verwendet (TNT[®]Quick Coupled Transcription/Translation System). Dabei bindet die T7-RNA-Polymerase den T7-Promotor entsprechender Expressionsvektoren und transkribiert die klonierte cDNA. Die resultierende RNA wird im Retikulozyten-Lysat translatiert, wobei dem methioninfreien Aminosäuremix [³⁵S]-Methionin beigefügt wird. Die Reaktion wurde den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

Zur Überprüfung der Reaktion wurden 1 – 2µl der Translationsansätze gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und in einem Autoradiogramm analysiert.

2.2.12 Dot overlay Assay

Intermolekulare Protein-Protein-Wechselwirkungen können im *dot overlay* Assay nachgewiesen werden. 25–50 pmol einer Proteinlösung wurden mittels eines Vakuum-Spotters (Biometra) auf Nitrozellulose aufgebracht, der Transfer durch Ponceaurot-Färbung überprüft und freie Bindungsstellen der Membran mit 5% (w/v) Magermilchpulver in TBST bei RT für 1 h abgesättigt. Nach Waschen mit PBS wurde die Membran mit 20µl *in vitro* translatiertem, radioaktivem Protein in 1.5ml Overlay-Puffer (TBST, 14mM β -Mercaptoethanol und Proteaseinhibitoren) für 3 h bei RT inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit Overlay-Puffer wurde die Membran getrocknet und mittels Autoradiographie analysiert.

2.2.13 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Um die Interaktion eines Proteins mit DNA nachzuweisen, können *electrophoretic mobility shift assays* durchgeführt werden. Dazu werden [32 P]-markierte doppelsträngige Oligodesoxynukleotide, die potentielle Bindungsmotive enthalten, mit dem entsprechenden Protein inkubiert und anschließend auf einem nativen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Findet eine Bindung des Proteins an die Oligodesoxynukleotide statt, erfolgt aufgrund des höheren Molekulargewichts der Komplexe ein „Shift“ der Oligodesoxynukleotide.

Doppelsträngige Oligodesoxynukleotide mit 5' überhängenden Guanidin-Resten wurden mittels der Klenow-Polymerase und [32 P]- α -dCTP radioaktiv markiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurde gemäß den Herstellerangaben über NAP-40-Säulen (Pharmacia) abgetrennt und die erhaltenen markierten Oligodesoxynukleotide mittels eines Szintillationszählers vermessen.

Zur Ausbildung von Protein - DNA Komplexen wurde *in vitro* translatiertes p42POP bzw. rekombinantes N-POP mit den doppelsträngigen Oligodesoxynukleotiden mreA bzw. OHL34/35 in einem Endvolumen von 25µl inkubiert. Ein Reaktionsansatz enthielt 45000cpm

[³²P]-endmarkierte ds Oligodesoxynukleotide, 2.5µl 10x Puffer (100mM Tris/Cl, 500mM NaCl, 10mM EDTA, 50% Glycerol; pH7.9), 2µg poly(dIdC) oder Heringssperma DNA als unspezifischen Kompetitor und *in vitro* translatiertes p42POP bzw. rekombinantes N-POP und wurde bei 30°C für 30min inkubiert. Für Konkurrenzexperimente wurde das *in vitro* translatierte Protein mit unterschiedlichen Mengen an nicht markierten Oligodesoxynukleotiden für 30min bei 30°C präinkubiert und anschließend für weitere 20min mit markierten Oligodesoxynukleotiden inkubiert. Die Salzabhängigkeit der Interaktion wurde durch Zugabe verschiedener NaCl Mengen untersucht.

Die Protein-DNA Komplexe wurden anschließend in einem nativen 5% Polyacrylamidgel (29:1; Acrylamid:Bisacrylamid) mit 0.5x TBE als Laufpuffer bei 10V/cm aufgetrennt, in 10% Essigsäure fixiert, getrocknet und durch Autoradiographie analysiert.

2.2.14 Präzipitation mittels poly-L-Prolin Sepharose

Um das Bindungsverhalten von Profilin nach Phosphorylierung bzw. verschiedener Profilin-Mutanten an poly-L-Prolin zu untersuchen, wurden Präzipitationen mit poly-L-Prolin gekoppelter Sepharose durchgeführt.

Dazu wurden Zellextrakte nach hypotoner Lyse (20mM Tris/Cl, 20mM NaCl; pH7.5) oder rekombinantes Protein mit poly-L-Prolin Sepharose (50% v/v in 20mM Tris/Cl, 150mM NaCl; pH7.5) für 60min unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Waschpuffer (20mM Tris/Cl, 150mM NaCl, 14mM β-Mercaptoethanol; pH7.5) wurde das Sediment in SDS-PAGE-Probenpuffer aufgenommen. Die Analyse erfolgte mittels Auftrennung des gebundenen Proteins durch SDS-PAGE, Transfer auf Nitrozellulose durch Semidry-Blot und Detektion durch entsprechende Antikörper bzw. Autoradiographie.

2.2.15 Bindungsstudien durch indirekte *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA)

ELISA-Studien wurden zur Analyse der Interaktion zwischen zwei Molekülen durchgeführt. 25pmol G-Aktin wurde in G-Aktinpuffer (2mM Tris/Cl, 0.4mM ATP, 0.05mM CaCl₂, 2mM DTE; pH8.3), um sicherzustellen, dass es in seiner monomeren Form vorliegt, in einem Endvolumen von 100 µl an eine 96-Loch-ELISA-Platte (Microlon; Greiner, Solingen) in bei 4°C gekoppelt. Als Negativkontrolle wurden 25pmol BSA eingesetzt. Ungebundenes Protein

wurde durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer (0.05% Tween20 in PBS) entfernt und freie Bindungsstellen mit je 200µl 1% BSA in PBS für 2h bei RT abgesättigt. Zur Analyse der Interaktion zwischen G-Aktin und p42POP wurden steigende Mengen rekombinantes His-Flag-N-POP bzw. entsprechender Mutanten zugegeben, die Negativkontrolle wurde mit 50pmol der entsprechenden Proteine inkubiert. Ungebundenes Protein wurde durch mehrmaliges Waschen entfernt, gebundenes mittels des anti-Flag Antikörpers M2 markiert. Als Sekundärantikörper diente ein HRP-gekoppelter Rabbit-anti-mouse Antiserum. Die Entwicklung erfolgte nach dreimaligem Waschen durch Zugabe von 100µl Substratlösung (0.4mM ABTS, 0.03% H₂O₂, 33mM Citronensäure, 17mM Natriumcitrat) und konnte im *Microplate Reader* (MRX, Dynatech Lab.) bei 405nm (Referenzwellenlänge 590nm) quantifiziert werden.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung von Zellkulturzellen

Die Zellen wurden in Gewebekulturschalen der Firma Nunc (Wiesbaden-Biebrich) in *Dublecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 10% FCS bei 37°C, 10% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für Immunfluoreszenzstudien wurden die Zellen auf beschichteten Deckgläschen gehalten.

2.3.2 Passagieren von Zellen

Zum Passagieren wurden die Zellen, nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS, mit einer Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert, bis sich ca. 50-70% der Zellen vom Gefäßboden gelöst hatten. Die Enzymwirkung wurde durch Zugabe des doppelten Volumens DMEM/10% FCS gestoppt, die Zellkonzentration mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die gewünschte Zellzahl replattiert.

2.3.3 Kryokonservierung von Zellen

Zur Langzeit-Konservierung wurden ca. 10^6 Zellen/ml nach dem Trypsinisieren in eisgekühltem Einfriermedium (20% FCS, 10% DMSO in DMEM) aufgenommen und langsam in Kryoröhrchen (Nunc) auf -80°C abgekühlt. Die längerfristige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zur Rekultivierung wurden die Zellen in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in Gewebekulturschalen plattiert.

2.3.4 Transiente Transfektion von Zellen

2.3.4.1 Calciumphosphat-Methode

Exogene DNA, die an Calciumphosphatkristalle angelagert ist, wird von tierischen Zellen unter geeigneten Pufferbedingungen phagozytotisch aufgenommen. Gelangt transfizierte, exogene DNA in den Zellkern, erfolgt dort unter der Kontrolle eines entsprechenden Promotors die Transkription der eingebrachten cDNA.

Zellen wurden ausgesät und 12-20h in serumhaltigem Medium inkubiert. 4h vor der transienten Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Plasmid-DNA wurde mit 20x CaCl_2 -Lösung (2.5M CaCl_2) und tropfenweiser Zugabe von 2x HEBS-Puffer (280mM NaCl, 50mM HEPES, 1.5mM Na_2HPO_4 ; pH 7.1) unter ständigem Mischen präzipitiert. Das Volumen eines Ansatzes richtete sich nach der Größe der eingesetzten Kulturschale und betrug 1/10 des Mediumvolumens. Nach 30 - 60min wurde das Präzipitat auf die Zellen gegeben und verteilt. Die Zellen wurden nach 16h Inkubation mit PBS gewaschen, mit frischem Medium versorgt und für weitere 4 - 24h inkubiert, bevor sie für Luciferase-Assays, Immunpräzipitationen oder Immunfluoreszenzen eingesetzt wurden.

2.3.4.2 Transfektion mit FuGeneTM Transfektionsreagenz

FuGeneTM Transfektionsreagenz ist ein nicht liposomaler Lipidmix, der eine hohe Transfektionseffizienz ermöglicht. Transiente Transfektionen für Luciferase Messungen, bei denen eine gleichmäßige und hohe Transfektionsrate erforderlich war, wurden zum Teil mittels dieses Agens durchgeführt.

1.5×10^5 Cos7-Zellen wurden pro well einer 6-well-Zellkulturschale ausgesät und 12-20h inkubiert. 0.5µg pRSV-lacZ, 1µg pGL3-mreA-Luciferase Reporterplasmid und unterschiedliche Mengen entsprechender pcDNA3-BiPro-p42POP-Konstrukte wurden mit 100µl serumfreiem DMEM mit 5µl FuGeneTM Transfektionsreagenz für 20-30 min inkubiert und tropfenweise zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden weitere 16-24h inkubiert und anschließend mit einem *cellscraper* geerntet.

2.3.5 Fixierung und Permeabilisierung von Zellen

Nach Transfektion und Kultivierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und bei RT durch 20 minütige Inkubation mit 4% (w/v) Formaldehyd in PBS fixiert. Anschließend erfolgte nach erneutem Waschen mit PBS eine Permeabilisierung der Zellen mit 0,2% Triton-X-100 in PBS für 15 min. Nach nochmaligem Waschen mit PBS konnte mit der Inkubation der Antikörper begonnen werden.

2.3.6 β -Galaktosidase Assay zur Bestimmung der Transfektionseffizienz einer transienten Transfektion

Der β -Galaktosidase Assay lieferte einen internen Standard, um unterschiedliche Transfektionseffizienzen einer Versuchsreihe abzugleichen und somit die einzelnen Messdaten zu korrelieren. Dazu wurde jedem Ansatz einer transienten Transfektion 1µg eines konstitutiv β -Galaktosidase exprimierenden Vektors (pCMV-NLS-lacZ oder pRSV-lacZ) zugesetzt. Nach Durchführung der Transfektion und Herstellung eines Proteinextrakts wurde die Enzymaktivität der β -Galaktosidase mit Hilfe des Substrates Chlorphenolrot- β -D-Galaktopyranosid (CPRG) bestimmt. Die Umsetzung des Substrates ist photometrisch bestimmbar und proportional der exprimierten Menge an exogener β -Galaktosidase, die ein Maß für die aufgenommene Menge an DNA darstellt.

10µl Proteinextrakt oder PBS (interne Kontrolle) wurde mit 70 µl Z-Puffer (60mM NaH₂PO₄, 40mM Na₂HPO₄, 0.01M KCl, 0.1M β -Mercaptoethanol) und 10µl 50mM CPRG gut durchmischt und bei 37°C bis zu einem sichtbaren Farbumschlag inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 900 µl 1M Na₂CO₃ gestoppt und die einzelnen Ansätze gegen den internen Standard bei 574 nm gemessen.

2.3.7 Luciferase-Assay

Der Luciferase-Assay stellt eine sensitive und reproduzierbare Methode dar, um die transkriptionelle Aktivität DNA-bindender Proteine zu testen. Dazu wurde neben der zu testenden cDNA und dem Gen für die β -Galaktosidase als interner Standard ein Reportergen (pGL3-mreA-Luciferase bzw. pGL3-OHL34/35-Luciferase) cotransfiziert. Erfolgt eine Bindung der potentiellen DNA-bindenden Proteine an die Myb-spezifischen Enhancer-Elemente mreA bzw. OHL34/35, wird das Luciferase-Gen transkribiert und translatiert. Die Transkription und Expression der Luciferase ist somit direkt von der Aktivität der transfizierten Transkriptionsfaktoren abhängig und enzymatisch mittels des *Steady Glo Luciferase Reagent* (Promega) nachweisbar.

Dafür wurden 100 μ l Zellsuspension (in PBS) mit 100 μ l *Steady Glo Luciferase Reagent* versetzt, für 5min bei RT inkubiert und in einem Luminometer vermessen. Zur Eliminierung der unterschiedlichen Transfektionseffizienzen wurden die erhaltenen Werte in Korrelation zu den β -Galaktosidase-Ergebnissen gesetzt.

2.3.8 Heterokaryon Assay

Um die Funktionalität eines Kernexportsignals (NES) und den Transfer eines Proteins zwischen dem Zellkern und dem Cytoplasma zu untersuchen, wurde ein Heterokaryon-Assay durchgeführt (Fan and Steitz, 1998a; Fan and Steitz, 1998b; Michael et al., 1995). HeLa Zellen wurden auf Glasdeckgläschen in einer Dichte von 2×10^5 Zellen ausgesät, mittels Calciumphosphat-Präzipitation transfiziert und 24 h nach Transfektion gewaschen. 2×10^5 Maus C2C12 Myoblasten, die in Gegenwart von 75 μ g/ml Cycloheximid (Sigma) inkubiert wurden, wurden auf dem selben Deckgläschen ausgesät. Nach Inkubation für 3 h mit 75 μ g/ml Cycloheximid, um *de novo* Proteinbiosynthese zu unterbinden, wurden die Zellen mit 50% Polyethylenglycol (PEG 3350; Sigma) für 2 min fusioniert, gewaschen und für weitere 3 h in Medium mit 100 μ g/ml Cycloheximid inkubiert. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen erfolgte die Analyse mittels Immunfluoreszenzmikroskopie.

2.3.9 Coimmunpräzipitation

Zur Analyse intermolekularer Wechselwirkungen unter physiologischen Bedingungen können Proteinkomplexe aus Zellen mittels spezifischer Antikörper immunpräzipitiert werden. Potentielle Liganden des präzipitierten Proteins können in anschließenden Immunblots spezifisch nachgewiesen und als Komponente dieses zellulären Proteinkomplexes identifiziert werden.

10⁶ HeLa Zellen wurden auf 10cm Kulturschalen ausgesät, nach 24h transient transfiziert und weitere 24h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 30min mit dem bivalenten, membranpermeablen und reduzierbaren *crosslinker* Dithiobis(succinimidyl propionate) (DSP; 0.5mM in PBS) bei 37°C inkubiert. Der Crosslinker wurde durch Waschen mit PBS entfernt und freie aktive Gruppen durch 15 minütige Inkubation mit 200mM Glycin in PBS abgesättigt. Nach wiederholtem Waschen wurden die Zellen mit 1ml RIPA-Puffer auf einer Wippe bei 4°C permeabilisiert. Anschließend wurden die permeabilisierten Zellen mit einem *cellscraper* abgekratzt, durch Ultraschallbehandlung vollständig aufgeschlossen und Zelltrümmer bei 4°C sedimentiert (13000 xg; 10min). Um unspezifische Bindung an die Sepharose zu verhindern wurde der Überstand mit 15µl einer 1:1 Suspension Protein-G-Sepharose in Blockpuffer (2% BSA in PBS) versetzt, für 1h unter Drehen bei 4°C inkubiert und die Sepharose bei 8000 xg sedimentiert. Für die Immunpräzipitation wurde der Überstand mit dem entsprechenden Antikörper über Nacht bei 4°C unter Drehen inkubiert. Zur Ausbildung sedimentierbarer Antikörperkomplexe wurde 40µl der Protein-G-Sepharose Suspension zugegeben und für 1h bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze dreimal mit RIPA-Puffer und einmal mit PBS gewaschen und zur Spaltung des *crosslinkers* 10min bei RT in SDS-PAGE-Probenpuffer mit 20% β-Mercaptoethanol inkubiert, für 10min bei 100°C aufgekocht und durch SDS-PAGE und Immunblot analysiert.

III ERGEBNISSE

Die Bedeutung der Profiline bei dynamischen Prozessen der Aktinpolymerisation, sowie während Differenzierungs- und Proliferationsvorgängen konnte in verschiedenen Spezies gezeigt werden (Schluter et al., 1997). Neben diesen vorrangig cytoplasmatischen Funktionen weisen Ergebnisse auf mögliche Aufgaben der Profiline im Zellkern hin. In Lokalisationsstudien konnte Profilin im Zellkern nachgewiesen werden (Mayboroda et al., 1997), wo es in *nuclear gems* mit dem *survival motor neuron protein* (SMN) colokalisiert und eventuell in die RNA-Prozessierung involviert ist (Giesemann et al., 1999). Zudem wurde eine direkte Verbindung zwischen dem Aktincytoskelett und der Genexpression des *Respiratory Syncytial Virus* (RSV) gezeigt, bei der Profilin modulierend auf die Genexpression wirkt (Burke et al., 1998; Burke et al., 2000). Zur weiteren Aufklärung der zellulären Funktion des cytoskelettalen Proteins Profilin wurde im Rahmen der Dissertation von Kathi Marquardt mittels des *Yeast two-hybrid* Systems ein unbekannter Bindungspartner, Δ POP1, identifiziert. Die gesamte cDNA¹ umfasst einen Bereich von 1913bp und kodiert für ein Protein von 393 Aminosäuren mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 41890 Da, das als p42POP bezeichnet wurde (*partner of profilin*). Da p42POP im Zellkern lokalisiert und Homologie zu Transkriptionsfaktoren der Myb-Familie aufweist, wurde dieses Protein detailliert charakterisiert, auch im Hinblick auf diskutierte potentielle Funktionen von Profilin im Zellkern.

1 p42POP zeigt Motiv-Homologien zu verschiedenen Proteinsequenzen

Ausgehend von der Aminosäuresequenz von p42POP wurden Datenbankrecherchen zur Identifizierung von Homologien zu bekannten Sequenzmotiven durchgeführt, um Informationen zur möglichen Funktion dieses unbekannten Proteins zu erhalten (Abb. 4).

¹ Die cDNA wurde in einer embryonalen Maus cDNA Bank (Tag 17) von Dr. Martin Rothkegel identifiziert.

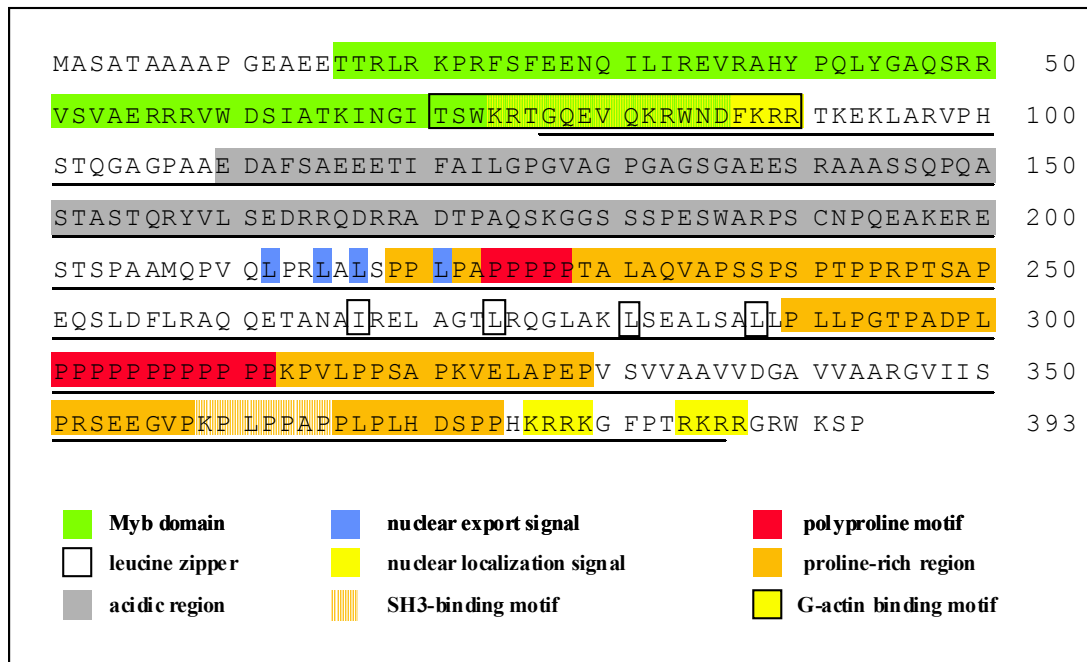


Abb. 4: Aminosäuresequenz von p42POP. Potentielle Sequenzmotive, basierend auf Datenbankrecherchen, sind farbig dargestellt und in der Legende erklärt. Die Aminosäuresequenz von Δ POP1 ist unterstrichen. GenBank Accession No. AF364868.

Der N-terminale Bereich des Proteins zeigt hohe Homologie zu der DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors c-Myb (Abb. 4, grün). Das DNA-Bindungsmotiv setzt sich bei tierischen Vertretern dieser Helix-turn-Helix Transkriptionsfaktoren aus drei Wiederholungen von 50-53 Aminosäuren zusammen. Diese Repeats, bestehend aus drei Helices, werden durch drei Tryptophanreste im Abstand von 19-21 Aminosäuren charakterisiert. Diese spielen bei der Ausbildung einer hydrophoben Tasche eine entscheidende Rolle und sind unmittelbar in die Protein-DNA-Interaktion involviert. p42POP enthält im Gegensatz zu den bisher bekannten Mitgliedern dieser Tryptophan-Kluster Proteinfamilie aus Vertebraten nur einen einzelnen sogenannten Myb-Repeat. Innerhalb dieses Motivs befindet sich ein potentielles G-Aktin Bindungsmotiv, das eine Homologie zur G-Aktin Bindungsdomäne von Thymosin β 4 aufweist, sowie ein Kernlokalisierungssignal (NLS, Abb. 4, gelb). Ein weiteres derartiges Kernimportmotiv befindet sich im C-Terminus des Proteins, was auf eine Lokalisation des Proteins im Zellkern hinweist und eine damit verbundene Funktion des Proteins in diesem Kompartiment vermuten lässt. In Analogie zu bekannten Myb-Transkriptionsfaktoren befindet sich C-terminal zu dem potentiell DNA-bindenden Motiv ein Sequenzbereich, der reich an sauren Aminosäuren ist (Abb. 4, grau). Derartigen sauren Bereichen konnte in verschiedenen Myb-Proteinen eine transkriptionsaktivierende Funktion zugewiesen werden.

Zudem konnte ein potentieller Leuzin-Zipper identifiziert werden, dessen regulatorischer Einfluß auf die transkriptionelle Aktivität von c-Myb beschrieben ist.

Des weiteren konnte ein *nuclear export signal* (NES, Abb. 4, blau) identifiziert werden, sowie drei prolinreiche Regionen (Abb. 4, orange), von denen zwei poly-L-Prolin Sequenzen beinhalten (P₅ in der ersten und P₁₂ in der zweiten prolinreichen Region, Abb. 4, rot). Die dritte prolinreiche Region umfasst ein mögliches SH3-Bindungsmotiv (KPLLAP, Abb. 4, orange gestreift) mit Homologie zum beschriebenen SH3-Bindungsmotiv R/KPLPP ψ P (ψ , hydrophober Rest) der Klasse 1.

Zur Verifizierung der cDNA-Sequenz und zur Überprüfung der Vollständigkeit des identifizierten Proteins wurden Datenbankanalysen und Vergleiche des Molekulargewichtes endogenen p42POP in verschiedenen Spezies mit exogenem Protein nach Transfektion mit der identifizierten cDNA durchgeführt. Die identifizierte cDNA, sowie unterschiedliche EST-Klone (*expressed sequence tags*) weisen 5' zum Startkodon, das mit der Kozaksequenz einen optimalen Translationsstart umfaßt, im entsprechenden Leseraster ein Stoppkodon auf. Zudem konnte endogenes p42POP im Westernblot in verschiedenen Zellkulturzellen (Abb. 5) mit dem monoklonalen anti-p42POP Antikörper 4D3 nachgewiesen werden und wies das gleiche Molekulargewicht wie das transfizierte, mit einem BiPro-Tag versehene p42POP auf.

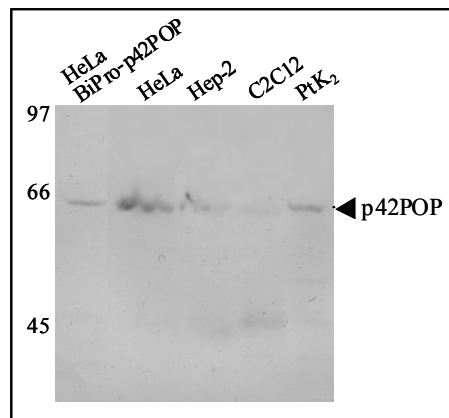


Abb. 5: Immunblot verschiedener Zellextrakte zur Detektion von endogenem p42POP
Proteinrohextrakte von jeweils 3×10^5 Zellen unterschiedlicher Zelllinien wurden im Immunblot auf die Expression von p42POP mit dem monoklonalen anti-p42POP Antikörper 4D3 analysiert. Als Positivkontrolle dienten mit pcDNA3-BiPro-p42POP transfizierte HeLa-Zellen.

2 Genstruktur und Genlocus von p42POP

Um Aufschluß über die Genstruktur zu erhalten, wurde eine genomische DNA-Bank (Maus, RZPD) mit zwei Digoxigenin-markierten DNA-Sonden, die die gesamte cDNA umfassten, durchsucht. Dabei wurden drei genomische Klone identifiziert, von denen sich zwei als identisch erwiesen. Beide unterschiedlichen Klone enthielten für p42POP kodierende DNA-Bereiche, unterschieden sich jedoch in ihren 5'- bzw. 3'-Regionen.

Durch Southernblot-Analysen, Sequenzierungen und Datenbankrecherchen konnte die genomische Struktur des p42POP-Gens analysiert werden (Abb. 6). Das p42POP kodierende Gen setzt sich aus vier Exonen zusammen, wobei nur zwei (Exon 2 und 3) den translatierten DNA-Bereich beinhalten.

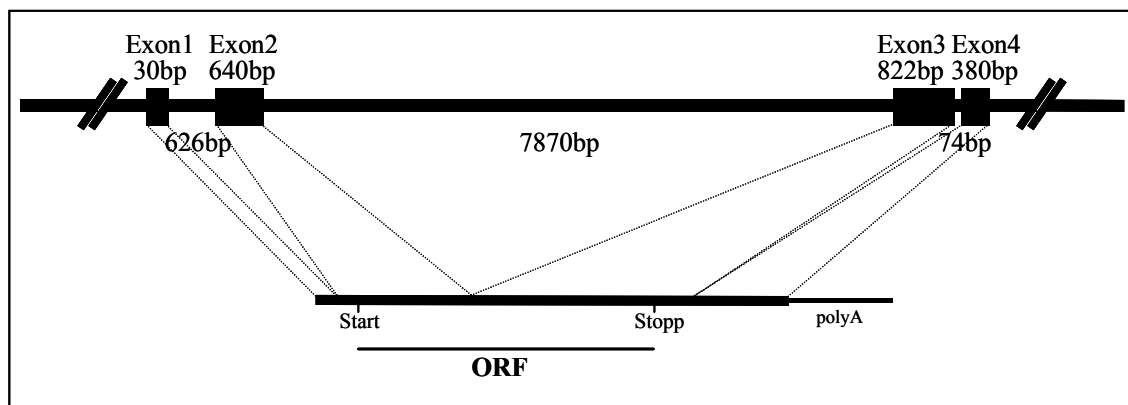


Abb. 6: Genstruktur von p42POP. Basierend auf zwei genomischen Klonen konnte die Exon-Intron-Struktur von Maus p42POP durch Southernblots, Sequenzierungen und Datenbankrecherche analysiert werden.

Das entsprechende p42POP-Gen konnte auf Chromosom 7 nachgewiesen werden, der exakte Maus Genlocus konnte bisher jedoch nicht ermittelt werden, da die genomischen Datenbanken keine entsprechenden Informationen enthielten. Ein humanes p42POP-Homolog konnte durch Datenbankanalysen auf Chromosom 19 identifiziert und dem Genlocus 19q13.32 zugewiesen werden. Homologievergleiche zwischen Maus und Mensch ergaben, dass es sich bei den identifizierten Genbereichen um korrespondierende Chromosomenabschnitte handelt.

3 p42POP wird in Mausgeweben ubiquitär exprimiert

Zur Analyse der gewebsspezifischen Expression wurden zunächst verschiedene in unserer Arbeitsgruppe gegen Δ POP1 generierte monoklonale Antikörper sowie polyklonale Seren in Immunblots mit verschiedenen Mausgeweben eingesetzt. Der Nachweis des endogenen Proteins p42POP war aufgrund der niedrigen Expressionsrate in Geweben im Gegensatz zu etablierten Zelllinien nicht möglich. Die Analyse der gewebsspezifischen Expression erfolgte entsprechend über den Nachweis von mRNA-Transkripten über quantitative RT-PCR. Basierend auf der genomischen Struktur von p42POP wurden dafür Oligodesoxynukleotide aus Exon 2 und Exon 3 in der PCR eingesetzt, um eventuelle genomische Verunreinigungen auszuschließen. In Vorversuchen wurde die Spezifität der Oligodesoxynukleotide überprüft und die PCR-Bedingungen optimiert. Für die Analyse der mRNA-Synthese von p42POP wurden standardisierte polydT-geprimte Erststrang-Synthesen der Firma Clontech (Mouse cDNA Panels I) eingesetzt, die mit acht verschiedenen Haushaltsgenen abgeglichen sind. Zur Verifizierung des erhaltenen Ergebnisses, wurden die PCR-Produkte anschließend im Southernblot nachgewiesen. Wie in Abbildung 7 dargestellt, wird p42POP ubiquitär exprimiert, wobei das Expressionsniveau im Gehirn, Herz und Hoden am höchsten ist. Zusätzlich war das Protein bereits am Tag 7 der Embryonalentwicklung nachweisbar.

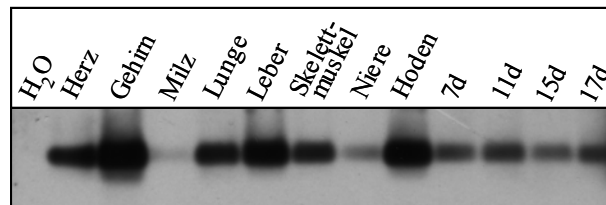


Abb. 7: Southernblot zur Analyse der gewebsspezifischen und entwicklungsspezifischen Expression von p42POP. Ausgehend von Erststrangsynthesen unterschiedlicher Mausgewebe und embryonaler Entwicklungsstadien, die mit verschiedenen Haushaltsgenen standardisiert wurden, wurden RT-PCRs zur Identifizierung von p42POP durchgeführt.

4 Konstruktion verschiedener p42POP-Fragmente auf Basis von Sequenzmotiven und Genstruktur

Um die unterschiedlichen Sequenzmotive (siehe Abb. 4) charakterisieren und potentielle Funktionen von p42POP identifizieren zu können, wurden basierend auf in der cDNA enthaltenen Restriktionserkennungssequenzen und über PCR Deletionsmutanten hergestellt (Abb. 8), die in verschiedenen experimentellen Ansätzen zum Einsatz kamen.

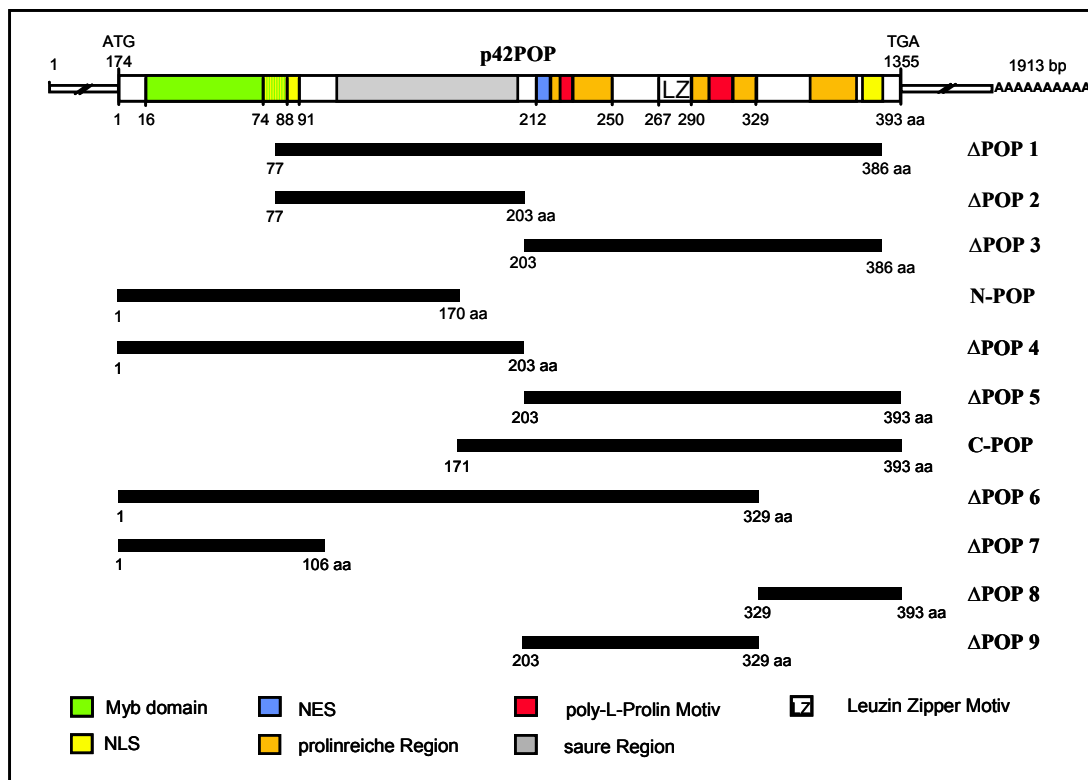


Abb. 8: Schematische Darstellung hergestellter Deletionsmutanten von p42POP, die in verschiedenen Studien eingesetzt wurden. Jeweils die erste und letzte Aminosäure im Bezug auf das gesamte Protein sind angegeben.

5 Die Myb-Domäne in p42POP ist funktionell

Zur Charakterisierung der Myb-Domäne von p42POP wurden, basierend auf publizierten Sequenzen bekannter Myb-Proteine, Homologievergleiche durchgeführt. In Abbildung 9 sind die Konsensussequenz und entsprechende Myb-Motive, die in Säugern, Insekten und Pflanzen identifiziert wurden, dargestellt.

	HHHH HHHHHHHHTTTTTTT TTHHHHHHHHHH
consensus	hXbGXWdX+E+XXhXXXXXXXX-----G-----XXXb-WXXhAXXhXXXXXXXX-RdXXXXb+RWXX
p42POP	TTRLRKPRFS F EENQILIREVRAHYPQLYGAQSRRVSVAEERR R WDS I ATKINGITSWK R TGQEV K -RWND
MM c-Myb (R1)	KRHLGKTR W TREDEKLKKLVEQN-----G-----TDDW K VIANYLPN-----RTDVQCQHR W QK
MM c-Myb (R2)	NPE L IKGP W TKEEDQ R VIELVQKY-----G-----PK R -WS V IAKHLKG-----RIGKQC R ERW H N
MM c-Myb (R3)	NPE V KKTS W TEEDRI I YQAHKRL-----G-----NR-WAE I AKLLPG-----RTDN A IKNH W NS
HS A-Myb (R1)	KKLWNRVK W TRDEDDKLKKLVEQH-----G-----TDDW T LIASHLQN-----RSDFQCQHR W QK
HS A-Myb (R2)	NPE L IKGP W TKEEDQ R VIELVQKY-----G-----PK R -WS L IAKHLKG-----RIGKQC R ERW H N
HS A-Myb (R3)	NPE V KKSS W TEEDRI I YEAHKRL-----G-----NR-WAE I AKLLPG-----RTDN S IKNH W NS
MybSt1	RERKKGVP W TEEEHRMFLLGLQKL-----G-----KGDW R G I ARNYVISRTPTQVASHAQKYFIR
AT MybL2	RPEVKQRNFSKDEDDLILKLHALL-----G-----NR-WS L IAGR L PG-----RTDNEV R IHW E T
ZM MYB1	RPDLKRGNFTDEEE E AIIRLHG L L-----G-----NK-WS K IAAC L PG-----RTDNEI K NVW N T
ZM MYB38	RPDLKRGNFTADEDDLIVKLHSL L -----G-----NK-WS L IAAR L PG-----RTDNEI K NYW N T
HV MYB1	RPDLKRGNFSHEEDEL I IKLHSL L -----G-----NK-WS L IAGR L PG-----RTDNEI K NYW N T
DM Adf-1	IEAVKLN P VIYDRSHYNYKH F VRK-----A-----Q T WKQ I AET L -G-----VPEQKCT K R W KS

Abb. 9: Sequenzvergleich des Myb-Motivs von p42POP mit beschriebenen Myb-Repeats verschiedener Myb-Proteine und Myb-verwandter Proteine. Fett dargestellte Aminosäuren stellen Übereinstimmung mit der Konsensussequenz (consensus; Rosinski and Atchley, 1998) dar. Die Aminosäuresequenz von p42POP wurde mit den Sequenzen der Myb-Repeats von Maus c-Myb, humanem A-Myb, Kartoffel MybSt1 (MybSt1; Baranowskij et al., 1994), Arabidopsis thaliana (AT MybL2; Kirik and Baumlein, 1996), Mais (ZM MYB1, ZM MYB38; Marocco et al., 1989), Hopfen (HV MYB1; Marocco et al., 1989) und Drosophila melanogaster (DM Adf-1; England et al., 1992) verglichen. Das Helix-Turn-Helix Motiv wurde durch "H" und "T" gekennzeichnet (Ogata et al., 1992).

h = I, L, A, V, M, F; d = S, T, Y; + = E, D; b = K, R, H; X = beliebige Aminosäure

Diese Analyse der Tryptophancluster-Domänen zeigt die Homologie zwischen p42POP und anderen Vertretern der Myb-Transkriptionsfaktoren in Bezug auf konservierte Aminosäurereste. Auffällig sind Insertionen innerhalb des Motivs von p42POP. Derartige Insertionen wurden bisher nur bei dem pflanzlichen Vertreter der Myb-Familie MybSt1 (Baranowskij et al., 1994) identifiziert. Die DNA-Bindungsdomäne dieses aus der Kartoffel isolierten Proteins besteht analog zu p42POP aus einem einzigen Myb-Repeat und weist auch in seinem modularem Aufbau Ähnlichkeiten zu p42POP auf. C-terminal zu dem Myb-Repeat schließt sich ein saurer Sequenzbereich an, gefolgt von einer prolinreichen Region. Eine

weitere Abweichung von der Konsensussequenz der Myb-Repeats in p42POP ist die Substitution des ersten der konservierten Tryptophanreste durch Phenylalanin. Dieser Austausch konnte bereits in verschiedenen pflanzlichen Myb-Proteinen identifiziert werden, hat jedoch keinen Einfluß auf die Funktionalität dieser DNA-bindenden Domäne.

Zur Analyse der DNA-Bindung von p42POP wurden *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) durchgeführt. Radioaktiv markierte Oligodesoxynukleotide, die das DNA-Bindungselement PyAACG/TG für Myb-Proteine enthielten, wurden mit *in vitro* translatiertem p42POP inkubiert und auf einem nativen Polyacrylamidgel analysiert. Nach Optimierung der Pufferbedingungen wurde die DNA-Bindung mit zwei verschiedenen doppelsträngigen Oligodesoxynukleotiden (mreA, enthält das Bindungselement in einfacher und OHL34/35 in doppelter Kopie) untersucht. In verschiedenen Ansätzen wurde zum einen die Salzabhängigkeit der DNA-Protein Interaktion, zum anderen wurde in Kompetitionsexperimenten die Spezifität der Wechselwirkung untersucht (Abb. 10). Dazu wurde p42POP mit unterschiedlichen Mengen nicht markierten Oligodesoxynukleotiden präinkubiert, bevor [³²P]-markierte Oligodesoxynukleotide zugegeben wurden. Als unspezifische Kompetitoren wurden dazu Oligodesoxynukleotide, die ein E-Box-Motiv enthielten, das eine Homologie zur Myb-Erkennungsmotiv aufweisen, und eine willkürlich gewählte DNA-Sequenz gewählt.

Wie in Abbildung 10 dargestellt, ermöglichen beide eingesetzten, spezifischen DNA-Sequenzen eine DNA-p42POP Interaktion. Anders als erwartet, bewirkten steigende NaCl-Konzentrationen eine verstärkte Komplexbildung. Dies könnte auf eine Stabilisierung der Myb-Domäne von p42POP zurückzuführen sein, da die DNA-Bindung durch einen hydrophoben Kern, der durch die α -Helices gebildet wird, vermittelt wird. Die Spezifität der Interaktion zeigte die vollständige Kompetition von [³²P]-markierten durch entsprechende, nicht markierte DNA-Sequenzen bei 100fach molarem Überschuß. Dagegen war der Einfluß der E-Box Sequenz schwächer und unspezifische doppelsträngige Oligodesoxynukleotide zeigten keinen Effekt auf die DNA-p42POP Komplexbildung (Abb. 10). Dies deutet auf eine spezifische Interaktion zwischen p42POP und Myb-spezifischen DNA-Erkennungsmotiven hin.

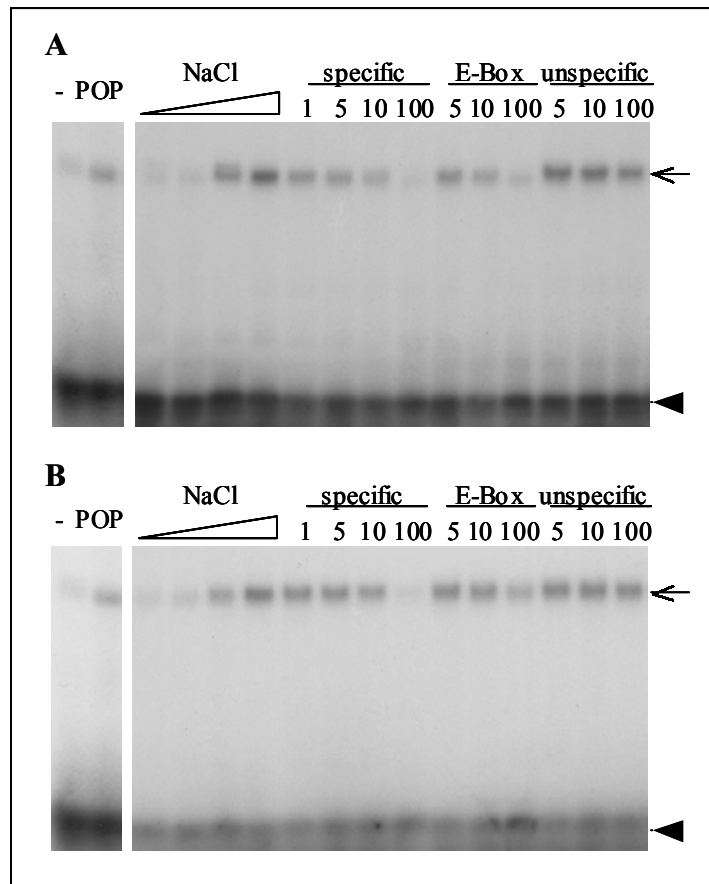


Abb. 10: Analyse der DNA-p42POP Interaktion durch EMSA. *In vitro* translatiertes p42POP wurde mit den angegebenen [32 P]-markierten Oligodesoxynukleotiden, die das Myb Erkennungsmotiv mim-1A des mim Promotors (A) enthalten oder OHL34/35 (B), das das Erkennungsmotiv in doppelter Ausführung beinhaltet, inkubiert. Die Salzabhängigkeit wurde mit steigenden NaCl-Konzentrationen (0, 50, 100, 200mM), während alle anderen Ansätze mit 50mM NaCl durchgeführt wurden, die Spezifität der Komplexbildung durch Konkurrenzexperimente mit steigenden Mengen an nicht markierten doppelsträngigen Oligodesoxynukleotiden untersucht. DNA-p42POP Komplexe wurden mit einem Pfeil, freie Oligodesoxynukleotide mit einer Pfeilspitze markiert.

Zur näheren Charakterisierung der DNA-bindenden Domäne von p42POP als Myb-Homolog wurden EMSA-Studien mit rekombinantem Protein durchgeführt. N-POP, ein C-terminal verkürztes p42POP-Fragment (siehe Abb. 8), und die Mutanten N-POP S25D und N-POP R83E/W84P wurden auf ihre Interaktion mit doppelsträngigen Oligodesoxynukleotiden *mreA*, die das Myb-Erkennungsmotiv enthalten, untersucht (Abb. 11). Zum einen sollte dadurch geklärt werden, ob p42POP als Monomer oder Homodimer an DNA bindet, da N-POP im Gegensatz zum gesamten Protein nicht dimerisiert (siehe III-7). Andererseits sollte der Einfluß der durch Datenbankanalysen identifizierten, potentiellen Phosphorylierungsstelle Serin 25, die unmittelbar neben dem erwähnten Phenylalanin liegt, und die Notwendigkeit des letzten Tryptophanrestes innerhalb der potentiellen Myb-Domäne untersucht werden.

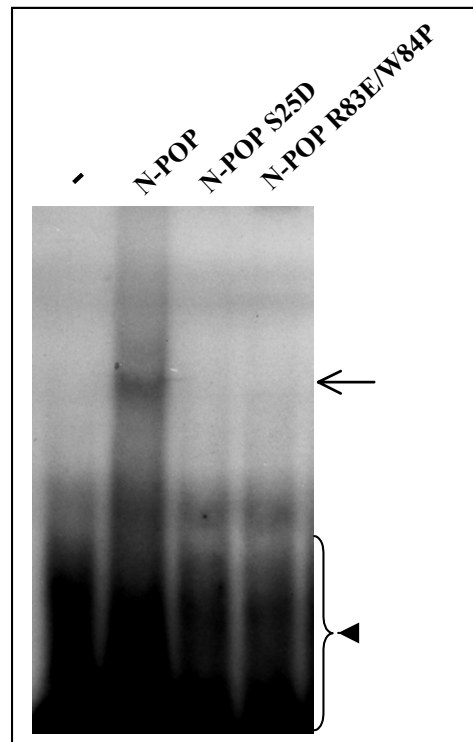


Abb. 11: EMSA zur Charakterisierung der DNA-bindenden Domäne von p42POP

Rekombinantes N-POP und verschiedene Mutanten, die Mutationen von konservierten Aminosäuren innerhalb der Konsensussequenz des *Myb-Repeats* aufweisen, wurden mit radioaktiv markiertem mreA inkubiert und auf DNA-Bindung untersucht. DNA-p42POP Komplexe wurden mit einem Pfeil, freie Oligodesoxynukleotide mit einer Pfeilspitze markiert.

Durch die eingefügten Mutationen wurde die Wechselwirkung mit den eingesetzten doppelsträngigen Oligodesoxynukleotiden mreA inhibiert, während das nicht mutierte, verkürzte p42POP-Fragment N-POP nicht in seiner DNA-Bindungsaktivität beeinflusst wurde. Dies deutet darauf hin, dass p42POP als Monomer an DNA binden kann und diese Bindung durch die Myb-Domäne vermittelt wird.

6 Die transkriptionelle Aktivität wird durch die saure Region von p42POP vermittelt

Analog zu c-Myb befindet sich in p42POP C-terminal zu der DNA-Bindungsdomäne (siehe Abb. 4) ein saurer Sequenzbereich (pI 4.6). Derartige Sequenzmotive wurden für verschiedene Myb-Transkriptionsfaktoren als transkriptionsaktivierende Bereiche charakterisiert. Um die transkriptionelle Aktivität von p42POP und den möglichen Einfluß der sauren Region zu analysieren, wurden Luciferase-Assays durchgeführt. Dabei wurde die transkriptionelle Aktivität durch den Nachweis des Reporterenzym Luciferase, das unter

Kontrolle eines Minimalpromotors und Myb-spezifischen Enhancerelementen exprimiert wurde, gemessen. HeLa Zellen wurden mit konstanten Mengen an Reporterplasmid pGL3-mreA-Luciferase bzw. pGL3-OHL34/35-Luciferase, pCMV-nls-lacZ (kodiert die β -Galaktosidase) und steigenden Mengen an Plasmiden, die p42POP oder Δ POP4 (siehe Abb. 8) kodieren, transfiziert. Der Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität ermöglichte die Korrelation der Messdaten mit der Transfektionseffizienz. Durch Normalisierung der Luciferaseaktivität auf die β -Galaktosidase war somit ein direkter Vergleich der unterschiedlichen Ansätze möglich.

Wie in Abbildung 12 dargestellt, ist p42POP in der Lage die Transkription von beiden Reporterplasmiden in Abhängigkeit der transfizierten Menge an pcDNA3-BiPro-p42POP zu aktivieren. Dabei bewirkte pGL3-OHL34/35-Luciferase, das das Myb Erkennungsmotiv PyAACG/TG zweimal enthält, eine höhere transkriptionelle Aktivierung als das singuläre Motiv in mreA (7-fache relative transkriptionelle Aktivierung im Vergleich zu 3-facher Aktivierung).

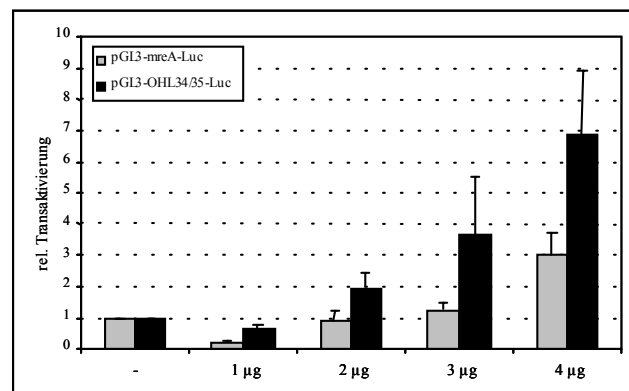


Abb. 12: p42POP induziert transkriptionelle Aktivierung in Abhängigkeit vom Myb DNA-Erkennungsmotiv PyAACG/TG. HeLa Zellen wurden mit verschiedenen Reporterplasmiden (pGL3-mreA-Luc, schwarze Balken und pGL3-OHL34/35-Luc, graue Balken) und p42POP transient transfiziert. Die relative Transaktivierung im Bezug zum Reporterplasmid ist auf der Ordinate dargestellt, die Mengen an Expressionsplasmid pro Kulturschale auf der Abszisse.

Um den Einfluß der sauren Region von p42POP auf die transkriptionelle Aktivierung zu untersuchen, wurden Luciferase-Assays mit der Deletionsmutante Δ POP4, die die DNA-Bindungsdomäne und den anschließenden sauren Bereich umfasst (siehe Abb. 8), durchgeführt. Analog zum gesamten Protein (Abb. 12), induziert Δ POP4 abhängig von der transfizierten DNA-Menge eine transkriptionelle Aktivierung ausgehend von beiden Reporterplasmiden (Abb. 13). Diese Aktivierung wies für Δ POP4 eine zu p42POP vergleichbare, lineare Abhängigkeit zur eingesetzten DNA-Menge auf. Diese Ergebnisse

implizieren, dass der N-terminale Bereich von p42POP ausreichend für die transkriptionelle Aktivierung ist und diese Aktivität in Analogie zu anderen Transkriptionsfaktoren der Myb-Familie durch die saure Region von p42POP vermittelt werden könnte.

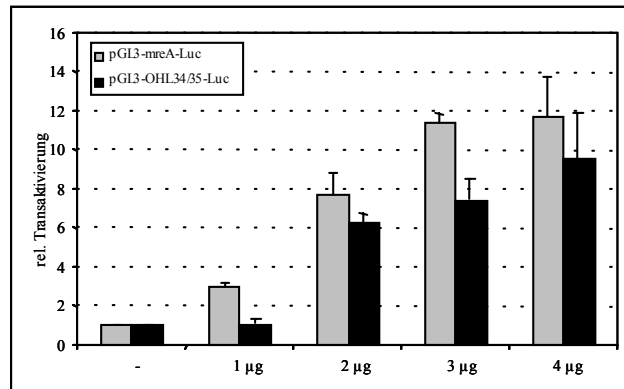






Abb. 13: Der N-terminale Bereich, der die DNA-Bindungsdomäne und die saure Region umfasst, vermittelt die transkriptionelle Aktivierung. HeLa Zellen wurden mit den beschriebenen Reporterplasmiden (pGL3-mreA-Luc, schwarze Balken und pGL3-OHL34/35-Luc, graue Balken), pCMV-nls-lacZ zur Eliminierung der Transfektionseffizienz und steigenden Mengen pcDNA3-BiPro-ΔPOP4 transfiziert.

Vergleiche der relativen Werte, die durch p42POP und ΔPOP4 induziert wurden, zeigen eine deutlich höhere, ΔPOP4-vermittelte transkriptionelle Aktivierung im Vergleich zum gesamten Protein (bis zu 9 fach für das mreA Element und bis zu 3 fach für OHL34/35). Diese Ergebnisse weisen auf potentielle, regulatorisch wirkende Bereiche in der C-terminalen Region von p42POP hin. Eine derartige negativ regulatorische Domäne konnte im C-Terminus von c-Myb identifiziert werden, deren Funktion unter anderem durch inter- bzw. intramolekulare Wechselwirkung, posttranslationale Modifikation und unterschiedliche Liganden moduliert wird.

7 p42POP dimerisiert über ein Leuzin-Zipper Motiv in der C-terminalen Region

Zur Analyse der potentiellen Bedeutung des C-terminalen Bereiches von p42POP wurde, basierend auf *dot overlay* Experimenten (Marquardt, 1998) und der für c-Myb beschriebenen Regulation der transkriptionellen Aktivierung durch Dimerisierung, die Selbstassoziation von p42POP detailliert charakterisiert. Verschiedene Deletionsfragmente von p42POP (siehe Abb. 8) wurden in *Yeast two-hybrid* Studien auf Interaktion mit dem gesamten Protein getestet (Tabelle 4).

Tab. 4: Dimerisierung von p42POP untersucht im *Yeast two-hybrid* System
(+: Interaktion im Filterassay; -: keine Interaktion)

	p42POP	
p42POP	+	
ΔPOP4	-	
ΔPOP5	+	
ΔPOP6	-	
ΔPOP8	-	
ΔPOP9	+	

Die in Tabelle 4 dargestellten Ergebnisse lassen eine Eingrenzung der Selbstassoziationsstelle auf den Bereich von Aminosäure 204 – 329 zu und bestätigen die beschriebene Region (AS204 – 385; Marquardt, 1998). Weder für das N-terminale Fragment ΔPOP4, noch für das C-terminale Polypeptid ΔPOP8 konnte im Filterassay eine Interaktion mit p42POP gezeigt werden, während sowohl p42POP, ΔPOP5 als auch ΔPOP9 mit dem gesamten Protein wechselwirkten. Die zu erwartende Interaktion von p42POP mit ΔPOP6, das den Aminosäurebereich zwischen As 204 und As 329 beinhaltet, war nicht nachweisbar. Dies könnte auf sterische Gründe, die durch den Fusionsanteil des GAL4-Transkriptionsfaktors bedingt sind, zurückzuführen sein. Um mögliche Sekundärstruktur motive zu identifizieren, die an der Selbstassoziation beteiligt sein können, wurde der entsprechende Bereich mittels des Programms Lasergene (DNAS tar, USA) analysiert. Diese Untersuchungen ergaben eine amphipathische Helix (As 250-290) innerhalb dieser Region, die ein potientes Leuzin-Zipper Motiv beinhaltet (Abb. 14).

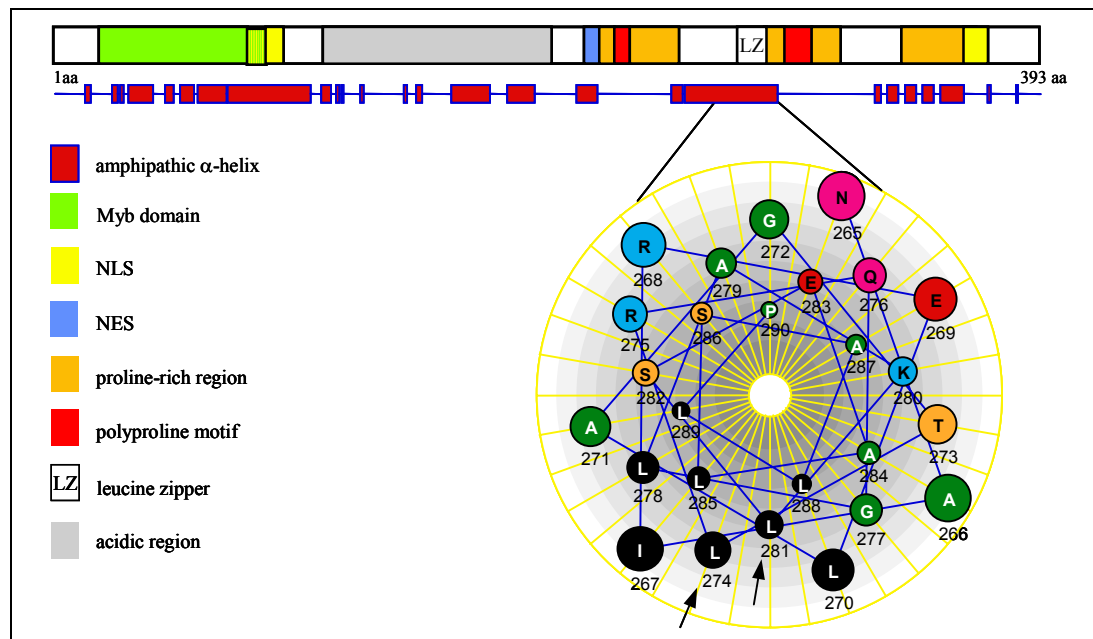


Abb. 14: Darstellung verschiedener Strukturmotive in p42POP. Die Berechnung der amphipathischen, α -helicalen Regionen basieren auf Analysen mit dem Programm Lasergene. Die helikale Projektion der Aminosäuren 265-290 zeigt deren amphipathischen Charakter und die Anordnung der Aminosäuren I267, L274, L281 und 288 zu einem Leuzin-Zipper. Zur Analyse des Einflusses des Leuzin-Zippers auf die Dimerisierung von p42POP wurden die mit Pfeilen markierten Leuzine mutiert.

Ein derartiges Motiv ist bei der Dimerisierung von c-Myb involviert und beeinflusst dessen transkriptionelle Aktivität. Entsprechend wurde der Einfluß des Leuzin-Zippers auf die Selbstassoziation von p42POP analysiert. Um die Bedeutung des helikalen Charakters und den darin enthaltenen Leuzin-Zipper für die Dimerisierung von p42POP zu untersuchen, wurden ortsgerichtete Mutagenesen des Deletionsfragmentes C-POP (siehe Abb. 8) durchgeführt. Mutanten mit einer einfachen Mutation des Leuzins L288 oder Doppelmutationen der Leuzine L274 und L288 zu Alanin wurden zur Analyse des Leuzin-Zippers generiert. Mutationen der entsprechenden Aminosäuren zu Prolin sollten zudem Aufschluß über die Notwendigkeit der α -helikalen Struktur geben (Abb. 14). Die Analyse des Einflusses der unterschiedlichen Mutanten auf das Dimerisierungsverhalten von p42POP erfolgte mittels Flüssigassays im *Yeast two-hybrid* System.

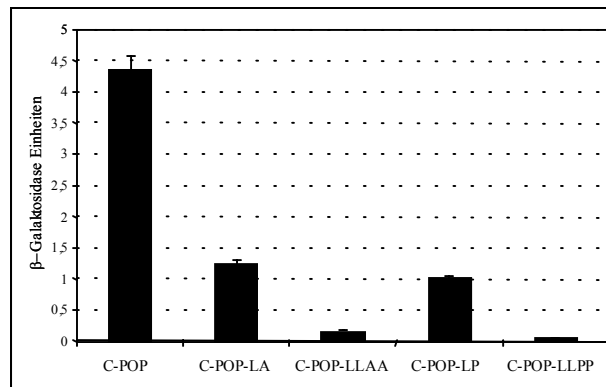


Abb. 15: Die Dimerisierung von p42POP wurde in *Yeast two-hybrid* Flüssigassays quantifiziert. pGBK-T7-p42POP und pGAD-T7-C-POP Konstrukte mit einem mutierten Leuzin-Zipper Motiv kamen dabei zum Einsatz. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert von vier unabhängigen β -Galaktosidase Aktivitätsmessungen, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Durch die beschriebenen Mutationen des Leuzin-Zipper Motivs konnte die Selbstaggregation von p42POP beeinflusst werden (Abb. 15). Dabei reduzierten einfache Substitutionen von L281 durch Alanin oder Prolin die Dimerisierung um den Faktor 3.5 bzw. 4.3. Die Doppelmutationen L274A/L281A und L274P/L281P inhibierten die Interaktion mit p42POP nahezu vollständig (Abb. 15). Die dargestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Selbstaggregation von p42POP durch den Leuzin-Zipper vermittelt wird und der amphipathische Charakter der Helix alleine für die Dimerisierung nicht ausreichend ist. Entsprechend stellt dieses funktionelle Motiv - analog zu c-Myb - ein mögliches regulatorisches Element für die transkriptionelle Aktivität von p42POP dar (Kanei-Ishii et al., 1992; Nomura et al., 1993), zumal in den dargestellten EMSA-Untersuchungen (siehe Abb. 11) gezeigt wurde, dass p42POP als Monomer an DNA bindet, und das verkürzte p42POP-Fragment Δ POP4, das den Leuzin-Zipper nicht beinhaltet, eine höhere transkriptionelle Aktivität als das gesamte Protein aufweist (siehe Abb. 12 und 13).

8 Negative Regulation der transkriptionellen Aktivität von p42POP durch den Leuzin-Zipper

Basierend auf den oben aufgeführten Ergebnissen, wurde der Einfluß des Leuzin-Zippers auf die durch p42POP vermittelte transkriptionelle Aktivität mittels der beschriebenen Mutanten untersucht. In Luciferase Assays wurden die Mutanten p42POP-L274A/L281A bzw. p42POP-L274P/L281P, die die Dimerisierung nahezu inhibierten, analysiert und deren transkriptionelle Aktivität mit der des Wildtypproteins verglichen (Abb. 16). Cos-7 Zellen

wurden dazu mit konstanten Mengen des Reporterplasmids pGL3-mreA-Luciferase, pRSV-lacZ, das die β -Galaktosidase kodiert, und steigenden Mengen an Plasmiden, die p42POP oder die Leuzin-Zipper Mutanten kodieren, transient transfiziert. Die durch p42POP induzierte Expression der Luciferase wurde, um potentiell unterschiedliche Transfektionseffizienzen miteinander abzugleichen, auf die β -Galaktosidase Aktivität bezogen.

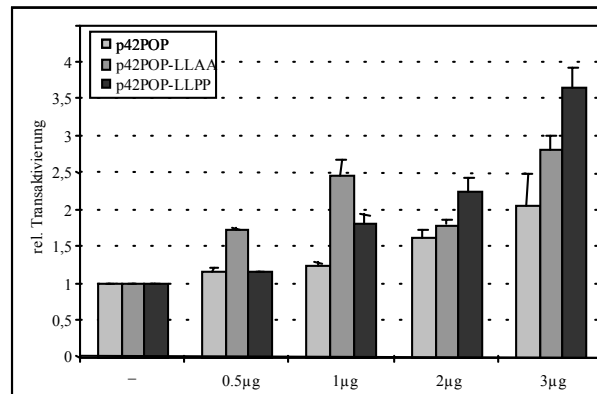


Abb. 16: Negative Autoregulation der transkriptionellen Aktivität durch den Leuzin-Zipper. pGL3-mreA-Luciferase und verschiedene p42POP Konstrukte wurden in Cos-7 Zellen exprimiert und der Einfluß des Leuzin-Zippers auf die transkriptionelle Aktivität analysiert. Die relative transkriptionelle Aktivierung im Bezug zum Reporterplasmid ist auf der Ordinate, die Mengen an Expressionsplasmid pro Kulturschale auf der Abszisse dargestellt.

In Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an p42POP bzw. der Mutanten p42POP-L274A/L281A und p42POP-L274P/L281P konnte eine Zunahme der relativen transkriptionellen Aktivität gezeigt werden (Abb. 16). Im Vergleich zum Wildtypprotein wiesen beide Mutanten eine höhere transkriptionelle Aktivität auf. In Analogie zu c-Myb konnte damit dem Leuzin-Zipper Motiv in p42POP eine negativ regulierende Funktion bei der Aktivierung der Transkription zugewiesen werden. Beide Mutanten, sowohl p42POP-LLAA als auch p42POP-LLPP, zeigten eine stärkere transkriptionelle Aktivität als das Wildtyp-Protein. Dies legt nahe, dass die Dimerisierung über den Leuzin-Zipper oder eine Wechselwirkung mit anderen Proteinen, die über dieses Motiv vermittelt wird, regulatorische Mechanismen der transkriptionellen Aktivität von p42POP darstellen können.

9 Phosphorylierung als potentieller Regulationsmechanismus der Dimerisierung

Da der Leuzin-Zipper einen modulierenden Einfluß auf die transkriptionelle Aktivität von p42POP nimmt, wurde der C-Terminus auf Sequenzmotive durch Datenbankanalysen untersucht, um Hinweise auf potentielle Regulationsmechanismen der Selbstaggregation von

p42POP zu erhalten. In der amphipathischen Helix, in der der Leuzin-Zipper lokalisiert ist, konnte eine potentielle Phosphorylierungsstelle der Serin/Threonin Proteinkinase C (PKC) identifiziert werden. Der Einfluß dieser Phosphorylierungsstelle auf die Selbstaggregation wurde durch die Generierung unterschiedlicher Mutanten untersucht. Die Simulation einer Phosphorylierung des Threoninrestes 273 (siehe Abb. 14) wurde durch die Einführung einer negativen Ladung in Form eines Glutamatrestes erzielt und durch die Mutagenese des Threonin 273 zu Valin wurde eine nicht phosphorylierbare Mutante hergestellt. Die Quantifizierung der Wechselwirkung zwischen p42POP und C-POP, C-POP T273E bzw. C-POP T273V erfolgte durch *Yeast two-hybrid* Flüssigassays im Hefestamm Y187 (Abb. 17).

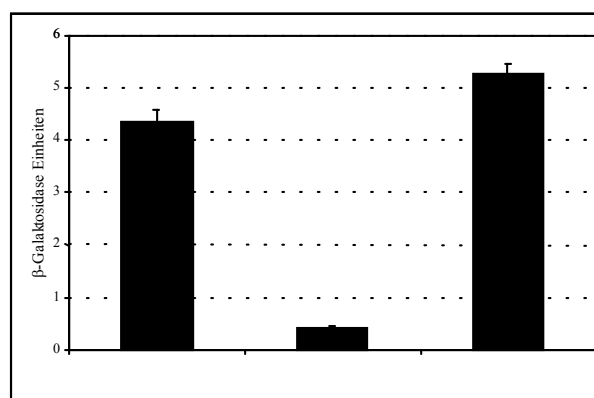


Abb. 17: Der Einfluß der PKC Phosphorylierungsstelle T273 auf die Dimerisierung von p42POP wurde im *Yeast two-hybrid* Flüssigassay untersucht. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert von vier unabhängigen β-Galaktosidase Aktivitätsmessungen, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Durch die Simulation einer Phosphorylierung des Threonins 273 infolge der Einführung einer sauren Aminosäure konnte eine Reduktion der Interaktion zwischen p42POP und C-POP T273E um Faktor 10 erzielt werden, wogegen die Einführung des Valins keinen Einfluß auf die Interaktion ausübte. Um diese mögliche Regulation der Dimerisierung biochemisch näher zu charakterisieren, wurde C-POP, sowie die Mutanten C-POP L274P/L281P und C-POP T273E als rekombinante His-tag Proteine in *E.coli* exprimiert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Jeweils 25pmol der gereinigten Proteine wurden in *chemical crosslink* Experimenten eingesetzt, um einen möglichen Einfluß der unterschiedlichen Mutationen auf das Dimerisierungsverhalten der Proteine zu untersuchen (Abb. 18).

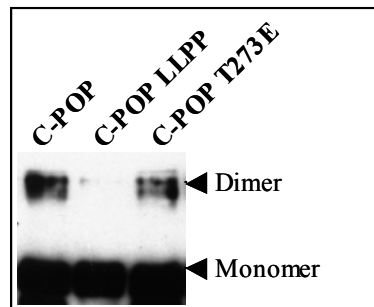


Abb. 18: *Chemical crosslinks* zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Mutationen auf das Dimerisierungsverhalten von C-POP. Je 25pmol der angegebenen, aufgereinigten Proteine wurden mittels des *crosslinkers* EDC/NHS quervernetzt, durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunblot mit dem anti-Flag Antikörper M2 detektiert. Die Pfeile markieren monomeres Protein und quervernetzte, dimere Proteinkomplexe.

Die dargestellten Ergebnisse geben keinen eindeutigen Hinweis auf eine Regulation der über den Leuzin-Zipper vermittelten Selbstaggregation von p42POP über eine durch PKC vermittelte Phosphorylierung des Threonins 273. Während rekombinantes C-POP Dimere bildet und diese Dimerisierung durch die Mutation im Leuzin-Zipper inhibiert wird und somit die im *Yeast two-hybrid* System erzielten Ergebnisse bestätigt wurden, zeigt die Simulation der Phosphorylierung durch die Mutante C-POP T273E mit den angewandten Methoden widersprüchliche Ergebnisse. Studien im *Yeast two-hybrid* System zeigten eine Inhibierung der Selbstassoziation infolge der Substitution von Threonin 273. Dagegen konnte mit rekombinantem C-POP T273E kein Einfluß auf das Dimerisierungsverhalten von p42POP nachgewiesen werden. Um diesen Sachverhalt zu klären, sind Phosphopeptidanalysen zur Bestätigung dieser potentiellen Phosphorylierungsstelle sowie *crosslink* Experimente mit rekombinantem, *in vitro* phosphoryliertem Protein notwendig.

10 Die Kernimport- und Kernexportsignale in p42POP sind funktionell

Zur Charakterisierung der identifizierten Kernimport- (NLS) und Kernexport- (NES) Signale (siehe Abb. 4) wurden PtK₂ Zellen transient mit verschiedenen p42POP Fragmenten (siehe Abb. 8), die mit dem *enhanced green fluorescence protein* (EGFP) oder einem BiPro-tag fusioniert waren, transfiziert. Die zelluläre Lokalisation der exprimierten Fragmente wurde durch fluoreszenzmikroskopischen Nachweis des autofluoreszierenden EGFP-Fusionsanteils oder Detektion des BiPro-tags durch den monoklonalen Antikörper 4A6 analysiert. p42POP und die Fragmente ΔPOP4, ΔPOP7 und ΔPOP8 lokalisierten überwiegend im Zellkern (Abb. 19A, C), was auf einen aktiven Transport der Fragmente in den Zellkern hinweist.

Entsprechend sind sowohl das N- als auch das C-terminale NLS Motiv in Abwesenheit des potentiellen NES Motivs funktionell. Dagegen konnten die Fragmente Δ POP6 und Δ POP9, die beide das Kernexportsignal enthalten, ausschließlich im Cytoplasma nachgewiesen werden (Abb. 19B, C). Das NES Motiv scheint einen stärkeren Einfluß auf die zelluläre Lokalisation zu nehmen als das N-terminal gelegene Kernimportsignal. Dagegen führt die Expression von Δ POP5, das das NES Motiv und das C-terminale Kernimportsignal umfasst, zu einer gleichmäßigen Verteilung zwischen Cytoplasma und Nukleus (Abb. 19C).

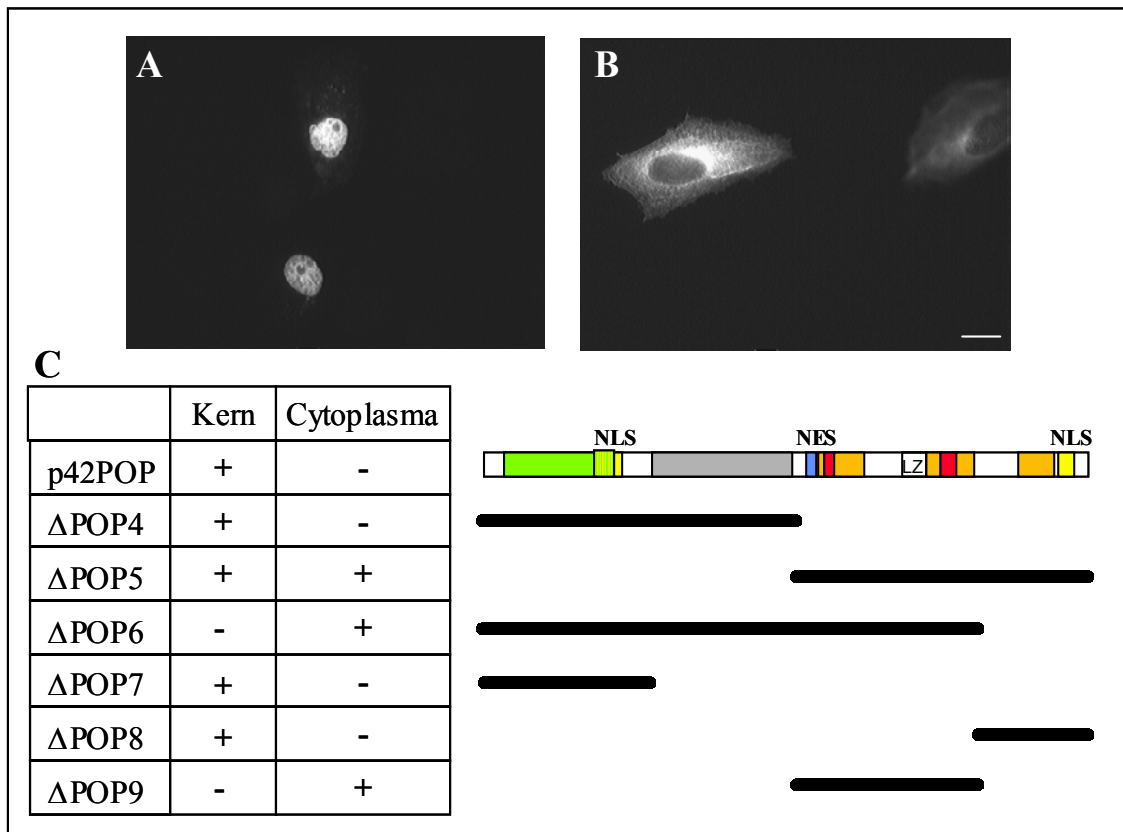


Abb. 19: Subzelluläre Lokalisation von p42POP und verschiedenen Fragmenten. Zur Analyse der potentiellen NLS und NES Motive wurden BiPro- oder EGFP-fusionierte Deletionsmutanten transient in PtK₂ Zellen transfiziert. (A) p42POP lokalisiert ausschließlich im Zellkern, wogegen (B) das Fragment Δ POP6 nur im Cytoplasma detektiert wurde. Der Nachweis beider Proteine erfolgte durch den anti-BiPro Antikörper 4A6 durch Immunfluoreszenz. (C) Die subzelluläre Lokalisation weiterer Fragmente von p42POP wurde mit EGFP-fusionierten Proteinen analysiert. Maßstab: 10µm

Da die dargestellten Ergebnisse keine eindeutige Aussage über die Funktionalität des Kernexportsignals zulassen, wurde ein Heterokaryonassay durchgeführt. Bei diesem Versuchsansatz werden humane und Maus Zellen mittels Polyethylenglykol zu mehrkernigen Heterokaryons fusioniert. Basierend auf der morphologischen Unterscheidbarkeit der Zellkerne von humanen und Maus Zellen, die durch DNA Färbung nachweisbar ist (Abb.

20B), kann der Transfer eines Proteins zwischen den Kernen von Heterokaryons aus HeLa und C2C12 Zellen dargestellt werden. HeLa Zellen wurden dazu transient mit BiPro-fusioniertem p42POP transfiziert, nach 24 stündiger Expression mit Cycloheximid inkubiert, um die Proteinbiosynthese zu inhibieren und zur Ausbildung von Heterokaryons mit C2C12 Myoblasten mittels einer Polyethylenglykol-Behandlung fusioniert (Abb. 20A). Die Lokalisation des transfizierten p42POP wurde in Immunfluoreszenzstudien mit dem anti-BiPro Antikörper 4A6 untersucht (Abb. 20C). In nicht fusionierten, transfizierten HeLa Zellen konnte p42POP ausschließlich im Zellkern nachgewiesen werden, dagegen wiesen unfusionierte C2C12 Zellen und Heterokaryons zwischen nichttransfizierten Zellen keine Kernfärbung auf (Abb. 20B, C). Heterokaryons, die durch Fusion von C2C12 Myoblasten mit transfizierten HeLa Zellen entstanden waren, enthielten hingegen sowohl in den HeLa, als auch in den C2C12 Zellkernen p42POP (Abb. 20C). Bei der Fusion einer transfizierten HeLa Zelle mit mehreren C2C12 Myoblasten konnte zudem eine Abnahme der Intensität des p42POP Signals in den C2C12 Zellkernen in Abhängigkeit zum Abstand zum HeLa Zellkern beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

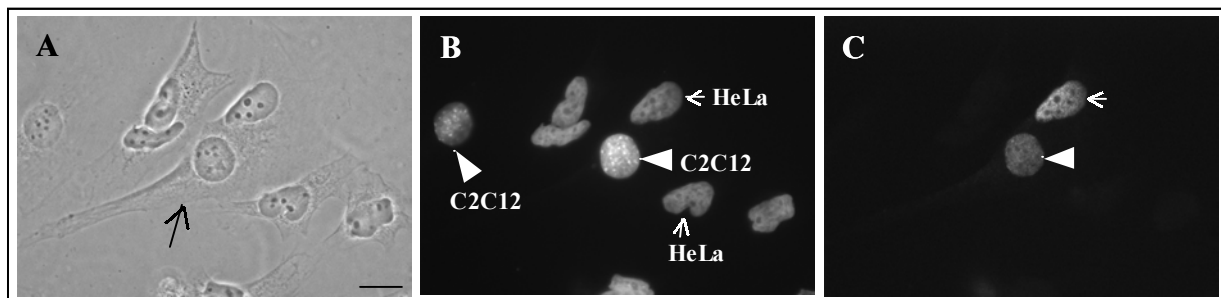


Abb. 20: p42POP transferiert zwischen Zellkern und Cytoplasma. HeLa Zellen wurden transient mit pcDNA3-BiPro-p42POP transfiziert und in Gegenwart von Cycloheximid mit C2C12 Myoblasten fusioniert, um Heterokaryons auszubilden. (A) Phasenkontrastaufnahme zur Darstellung von Heterokaryons (Pfeil). (B) Morphologische Unterscheidung der Maus Nuclei (Pfeilspitzen) und humanen Zellkernen (kurze Pfeile) durch Färbung mit Hoechst Farbstoff. (C) Detektion transient exprimierten, BiPro-fusionierten p42POPs durch den monoklonalen anti-BiPro Antikörper 4A6. Maßstab: 10µm

Die Lokalisation der eingesetzten p42POP-Fragmente und die Analyse im Heterokaryonassay zeigten eindeutig, dass die in p42POP mittels Datenbankanalyse identifizierten Kernimport- und Kernexportsignale funktionell sind. Die gezeigte Kernlokalisation von transfiziertem p42POP (Abb. 19A, 20C) steht dabei in Einklang mit seiner Funktion als Transkriptionsfaktor.

11 p42POP interagiert mit monomerem Aktin

Neben unterschiedlichen funktionellen Motiven und Bindungsstellen für verschiedene potentielle Liganden (poly-L-Prolin Motive, Bindungsmotive für SH3-Domänen; siehe Abb. 4) konnte durch Homologievergleiche ein Thymosin β 4 ähnliches Bindungsmotiv für G-Aktin im N-terminalen Bereich von p42POP identifiziert werden (Abb. 4, 21A), das eine Überlappung mit der N-terminal gelegenen NLS und der Myb-Domäne aufweist. In *dot overlay* Experimenten mit [35 S]-Methionin markiertem p42POP konnte eine Interaktion mit Aktin gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Analysen der Sekundärstruktur von p42POP durch das Programm Lasergene (DNASar, USA) ergaben für die durch Homologievergleiche identifizierte Region eine amphipathische Helix mit einem hydrophoben und basischen Bereich (Abb. 21B). Um den Einfluß des basischen und hydrophoben Bereiches auf die Interaktion zwischen p42POP und G-Aktin näher zu charakterisieren, wurden verschiedene Mutanten generiert und in ELISA-Studien analysiert (Abb. 21 und 22). Dazu wurden 25pmol G-Aktin unter Bedingungen, die G-Aktin stabilisierten, bzw. BSA als Negativkontrolle pro Loch einer ELISA-Platte immobilisiert und mit steigenden Mengen der verschiedenen rekombinanten Proteine (N-POP, N-POP K82E/R83E, N-POP R89E/R90E, N-POP T91A und N-POP T91E) inkubiert.

Um die Bedeutung des basischen Bereiches zu untersuchen, wurden die Mutanten N-POP K82E/R83E und N-POP R89E/R90E eingesetzt und mit dem Bindungsverhalten des genuinen Polypeptids N-POP in Bezug gesetzt (Abb. 21). Aus Abbildung 21D wird ersichtlich, dass der N-terminale Bereich von p42POP eine Interaktion mit G-Aktin vermittelt. Dagegen zeigte keine der beiden eingesetzten Mutanten N-POP K82E/R83E oder N-POP R89E/R90E, die den basischen Charakter der amphipathischen α -Helix störten, eine signifikante Bindung an G-Aktin. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass der basische Bereich der amphipathischen Helix notwendig für die Interaktion zwischen dem N-terminalen Bereich von p42POP und G-Aktin ist und es sich bei dem über Sequenzvergleiche identifizierten Motiv um ein Thymosin β 4 ähnliches Bindungsmotiv handelt.

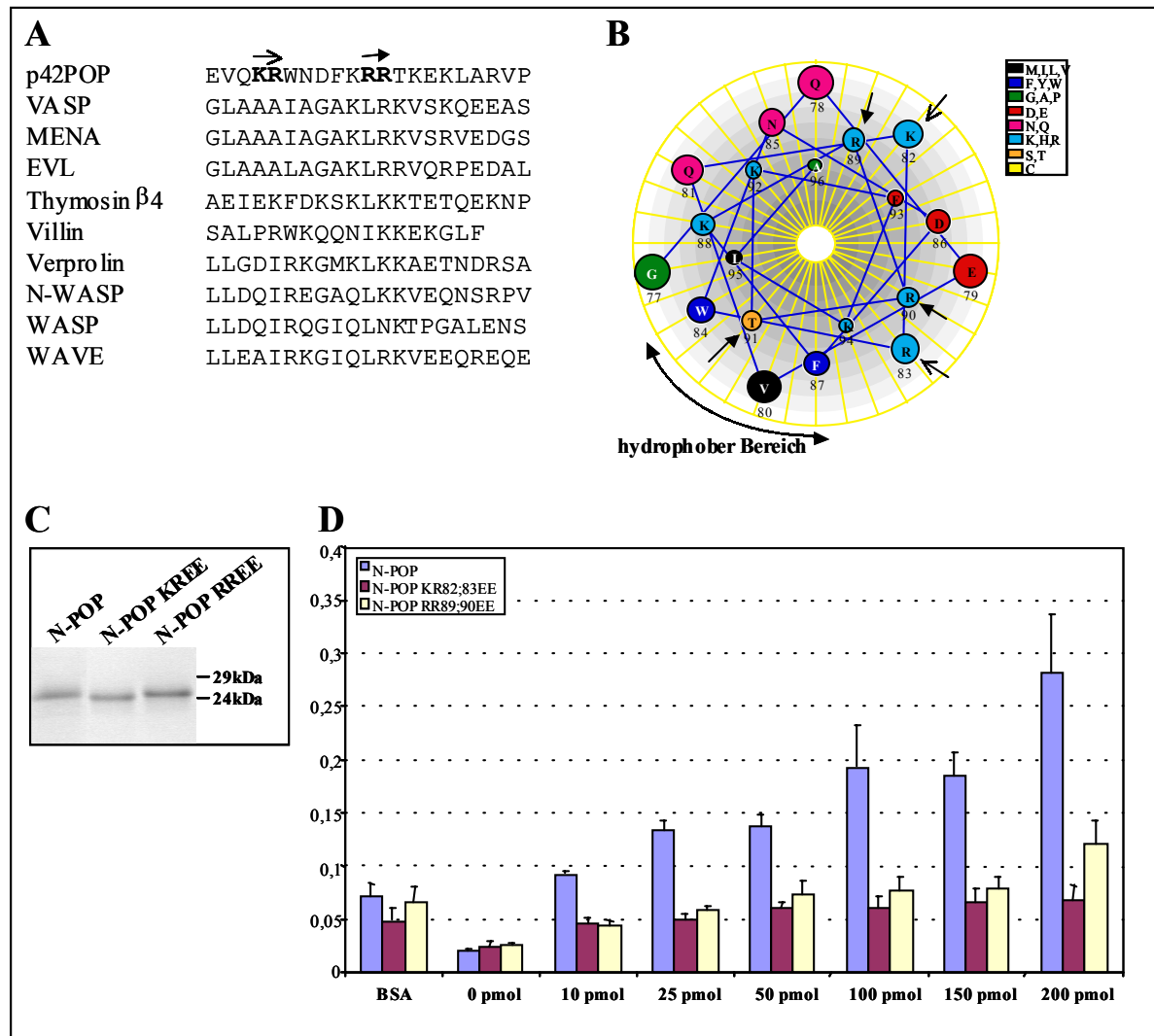


Abb. 21: ELISA-Studien zur Interaktion zwischen N-POP und G-Aktin. (A) Sequenzvergleich verschiedener G-Aktin Bindungsmotive. (B) Darstellung der amphipathischen Helix von p42POP. Die mutierten Aminosäuren sind mit Pfeilen markiert. (C) Coomassie-gefärbtes PAA-Gel zum Vergleich der eingesetzten, rekombinanten Proteinmengen. (D) Steigende Mengen der angegebenen, rekombinanten Proteine wurden mit 25pmol immobilisiertem G-Aktin bzw. BSA als Negativkontrolle inkubiert. Gebundenes Protein wurde mit dem anti-Flag Antikörper M2 detektiert. Die dargestellten Balken stellen den Mittelwert aus drei Experimenten mit der als Strich angegebenen Standardabweichung dar.

Da im Falle von Thymosin β 4 neben dem basischen Bindungsmotiv (z.B. KLKK) auch hydrophobe Aminosäurereste modulierend auf die Interaktion mit G-Aktin wirken, wurde ein entsprechender hydrophober Bereich innerhalb der dargestellten Helix von p42POP (Abb. 21B) näher charakterisiert. Dazu wurden Mutanten generiert, die eine Phosphorylierung des Threonin T91 (siehe Abb. 21B) simulieren bzw. inhibieren (N-POP T91E bzw. N-POP T91A) und in ELISA-Untersuchungen auf die Wechselwirkung mit Aktin untersucht (Abb. 22). Durch die Einführung einer geladenen Aminosäure sollte zudem der hydrophobe Charakter der Helix gestört werden.

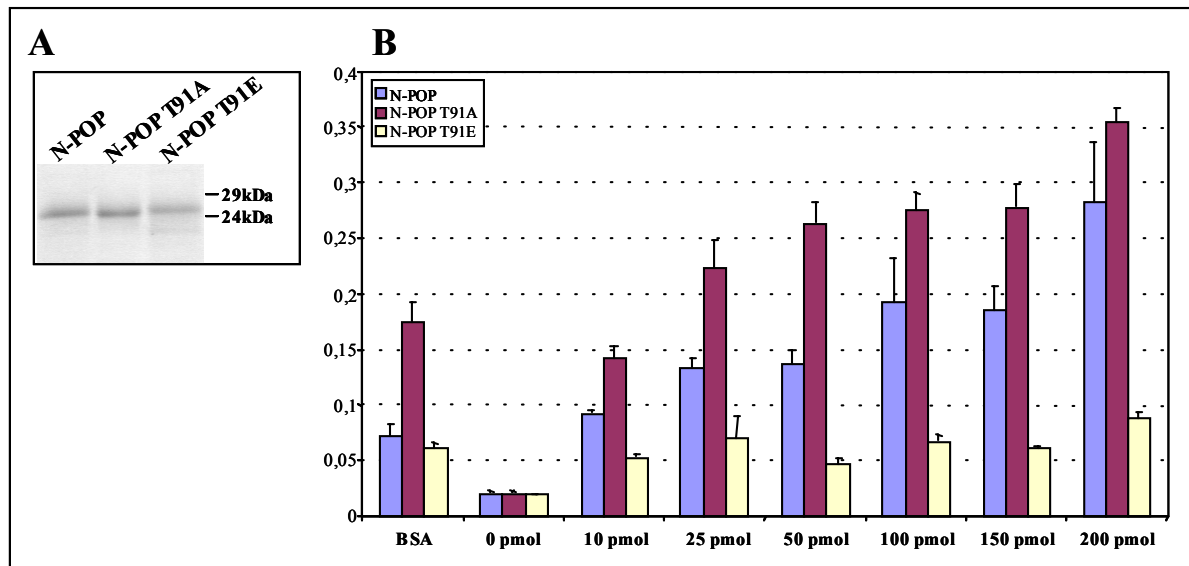


Abb. 22: ELISA-Studien zur Untersuchung des Einflusses des hydrophoben Bereiches auf die Interaktion zwischen N-POP und G-Aktin. (A) Coomassie-gefärbtes PAA-Gel zum Vergleich der eingesetzten, rekombinanten Proteinmengen. (B) Steigende Mengen der angegebenen, rekombinanten Proteine wurden mit 25pmol immobilisiertem G-Aktin bzw. BSA als Negativkontrolle inkubiert. Gebundenes Protein wurde mit dem anti-Flag Antikörper M2 detektiert. Die dargestellten Balken stellen den Mittelwert aus drei Experimenten mit der als Strich angegebenen Standardabweichung dar.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen einen signifikanten Einfluß der Mutante N-POP T91E auf die Interaktion mit Aktin. Die Einführung des Alanins, durch die der hydrophobe Charakter nur schwach modifiziert wurde, bewirkte im Vergleich zum genuinen N-POP keinen signifikanten Einfluß auf die Interaktion mit G-Aktin. Die vergleichsweise starke Bindung zwischen N-POP T91A und BSA konnte in anderen Experimenten nicht in diesem Maß beobachtet werden und stellt die erhaltenen Daten nicht in Frage. Die Simulation einer Phosphorylierung durch die Einführung einer sauren Aminosäure und die damit bedingte erhebliche Störung des hydrophoben Charakters der amphipathischen Helix reduzierte die Interaktion zwischen N-POP und Aktin stark. Die unterschiedlichen Affinitäten der generierten Mutanten N-POP T91A und N-POP T91E zu G-Aktin unterstreichen die Bedeutung des hydrophoben Bereiches innerhalb der α -Helix und bestätigt die durch Homologievergleiche identifizierte Thymosin β 4-ähnliche G-Aktin-Bindungsregion.




Zur Charakterisierung der potentiellen Phosphorylierungsstelle Threonin 91 wurden *in vitro* Phosphorylierungsanalysen durchgeführt, um Aufschluß über eine mögliche Regulation der Interaktion zwischen N-POP und G-Aktin zu erhalten. Phosphorylierungsstudien von N-POP und N-POP T91A mit der katalytischen Untereinheit der PKA ergaben, dass es sich bei der mutierten Aminosäure zumindest um keine PKA-spezifische Phosphorylierungsstelle handelt.

Weitere Untersuchungen sind in diesem Zusammenhang notwendig, um einen möglichen Regulationsmechanismus der Interaktion zwischen p42POP und Aktin zu identifizieren.

12 Prolinreiche Motive in p42POP vermittelt die Interaktion mit Profilin-Isoformen

Ursprünglich wurde p42POP als Profilin Ligand im *Yeast two-hybrid* System identifiziert (Marquardt, 1998). Da für eine Interaktion zwischen den Profilin-Isoformen I und IIa mit poly-L-Prolin Liganden eine Abfolge von acht aufeinanderfolgenden Prolinresten ausreichend ist (Domke et al., 1997; Machesky and Pollard, 1993), wurde die Bedeutung der prolinreichen Regionen in p42POP (siehe Abb. 4) für die Interaktion mit Profilin I und IIa näher untersucht. Dazu wurden *dot overlay* Untersuchungen mit immobilisiertem Maus Profilin I und IIa und *in vitro* translatierten, [³⁵S]-Methionin-markierten p42POP sowie verschiedenen Deletionsfragmenten durchgeführt. Die Bindungsregion konnte mittels der eingesetzten Deletionsfragmente auf den Aminosäurenbereich As 203 – As 329 eingegrenzt werden (Daten nicht gezeigt). Dieser Bereich beinhaltet neben prolinreichen Regionen auch die poly-L-Prolin Motive P₅ und P₁₂ (siehe Abb. 4), wobei das letztere ausreichend für die Interaktion mit Profilinen ist (Domke et al., 1997; Machesky and Pollard, 1993). Die Eingrenzung der Bindungsstelle von p42POP auf die Aminosäuren 203-329 konnte im *Yeast two-hybrid* System bestätigt werden. Der *S. cerevisiae* Stamm HF7c wurde dazu mit den Vektoren pGBKT7-MPI bzw. -MPIIa und den entsprechenden, in Tabelle 5 aufgeführten p42POP-Konstrukten im Vektor pGADT7 cotransformiert und die Interaktion über die β -Galaktosidase-Aktivität nachgewiesen.

Tab. 5: Interaktion von Maus Profilin I und IIa mit p42POP und verschiedenen Deletionsfragmenten

	MPI	MPIIa	
p42POP	+	+	
ΔPOP4	–	–	
ΔPOP5	+	+	
ΔPOP6	+	+	
ΔPOP8	–	–	
ΔPOP9	+	+	

Die Interaktion der Profilin-Isoformen I bzw. IIa mit p42POP und verschiedenen Fragmenten wurde im *Yeast two-hybrid* System untersucht. +: Interaktion; -: keine Interaktion

Das gesamte Protein p42POP und die Fragmente ΔPOP5, ΔPOP6 sowie ΔPOP9, die die prolinreiche Region inklusive der poly-L-Prolin Motive beinhalten, interagierten mit beiden Profilin-Isoformen. Dagegen konnte keine Wechselwirkung der Fragmente ΔPOP4 und ΔPOP8, die die entsprechenden Sequenzbereiche nicht umfassen, mit Profilin I und IIa nachgewiesen werden (Tab. 5). Um die erhaltenen Ergebnisse unter *in vivo* Bedingungen zu bestätigen, wurden Immunpräzipitationen mit Extrakten aus transfizierten HeLa Zellen nach *in situ crosslinking* zur Stabilisierung von Proteinkomplexen durchgeführt. p42POP und ΔPOP6, die beide die poly-L-Prolin Motive P₅ und P₁₂ umfassen, wurden dazu, fusioniert mit einem BiPro-tag, transient in HeLa Zellen exprimiert. Zur Stabilisierung der Proteinkomplexe erfolgte vor der Lyse der Zellen ein *in situ crosslinking* mit dem membranpermeablen, reduzierbaren *crosslinker* DSP. Als Negativkontrolle wurden HeLa Zellen mit BiPro-p42POP transfiziert, jedoch wurden Proteinkomplexe nicht mit dem *crosslinker* DSP stabilisiert. Unter den sehr stringenten Versuchs- und Waschbedingungen (150mM NaCl, 1% Triton X-100) dissoziieren zelluläre, nicht stabilisierte Proteinkomplexe, und somit kann eine mögliche Kreuzreaktivität des zur Immunpräzipitation eingesetzten Antikörpers untersucht werden. Nach Immunpräzipitation mit einem gereinigten, gegen ΔPOP1 generierten Antiserum wurden präzipitierte Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunblot analysiert (Abb. 23). Die Detektion der immunpräzipitierten Proteine p42POP und ΔPOP6 erfolgte durch den gegen das BiPro-tag gerichteten monoklonalen Antikörper 4A6, um eine Kreuzreaktion des Zweitantikörpers mit den schweren Ketten des zur Immunpräzipitation eingesetzten polyklonalen Serums zu unterbinden. Der Nachweis von

endogenem Profilin I wurde mit dem monoklonalen Antikörper 2H11 (Mayboroda et al., 1997) durchgeführt.

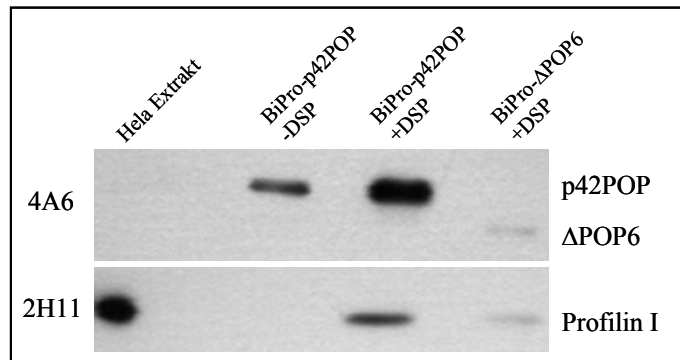


Abb. 23: Immunpräzipitationen von p42POP-Profilin I und Δ POP6-Profilin I Komplexen aus transient transfizierten HeLa Zellen. BiPro-fusioniertes p42POP bzw. Δ POP6 wurden nach *in situ* crosslinking durch den membranpermeablen *crosslinker* DSP mit einem anti-POP Antiserum aus Zelllysaten präzipitiert und im Immunblot analysiert. Der Nachweis des endogenen Profilin I erfolgte durch den monoklonalen anti-Profilin Antikörper 2H11, BiPro-p42POP und BiPro- Δ POP6 wurden durch den monoklonalen anti-BiPro Antikörper 4A6 detektiert. Als Kontrollen dienten ein Proteinextrakt von untransfizierten HeLa Zellen und p42POP transfizierte Zellen ohne DSP-Behandlung.

Sowohl p42POP, als auch das Fragment Δ POP6 copräzipitierten die in HeLa Zellen endogen exprimierte Profilin-Isoform I. Die durchgeführte Negativkontrolle zeigte eindeutig, dass das eingesetzte polyklonale Antiserum keine Kreuzreaktion zu endogenem Profilin I aufweist und Profilin I nicht präzipitiert. Diese Interaktion wurde auch in einem weiteren experimentellen Ansatz gezeigt. Dazu wurden PtK₂ Zellen transient mit Δ POP6 transfiziert, das C-terminal an ein Sequenzmotiv eines mitochondrialen Membranproteins (MOM – *mitochondrial outer membrane*) und des BiPro-Tags fusioniert wurde (Abb. 24). Durch dieses MOM-Sequenzmotiv erfolgt eine spezifische Lokalisierung entsprechender Fusionsproteine an die mitochondriale Membran, so dass eine Rekrutierung von Liganden durch Immunfluoreszenz untersucht werden kann (Kaufmann et al., 2000). Da die Kernimportsignale des gesamten Proteins p42POP in ihrer Funktion einen stärkeren Einfluß auf die Lokalisation des Proteins hatte als der MOM-Anker (Daten nicht gezeigt), wurde dieser Versuch mit dem cytoplasmatisch lokalisiertem Fragment Δ POP6 (siehe Abb. 19B) durchgeführt.

In transfizierten PtK₂ Zellen konnte die Lokalisierung von MOM-fusioniertem Δ POP6 (Abb. 24B) an die Mitochondrien durch den spezifischen mitochondrialen Farbstoff MitoTracker™ mittels Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 24A) und somit die Funktionalität des eingesetzten Konstruktes pcDNA3-MOM-BiPro- Δ POP6 nachgewiesen werden. Die Colokalisation von

Profilin I in transfizierten Zellen an den Mitochondrien mit Δ POP6 weist auf eine Rekrutierung des endogenen Profilin I durch Δ POP6 (Abb. 24C, D) hin und bestätigt die bisher beschriebenen Ergebnisse zur Interaktion der beiden Proteine.

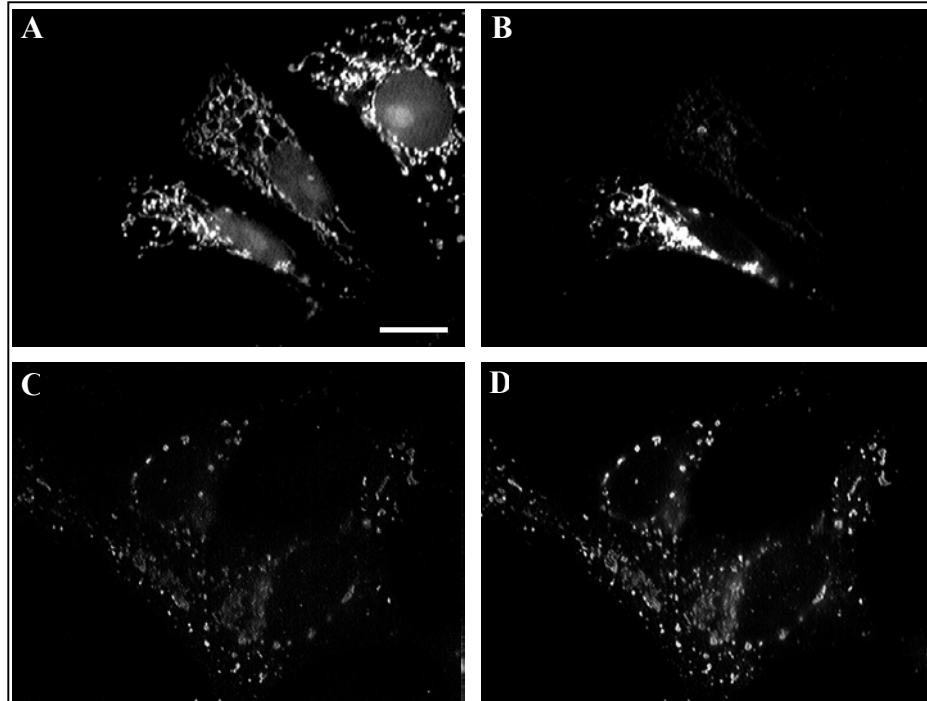


Abb. 24: Mitochondriale Rekrutierung von endogenem Profilin I durch MOM-BiPro- Δ POP6. PtK₂ Zellen wurden transient mit pcDNA-MOM-BiPro- Δ POP6 (A-D) transfiziert. Doppelimmunfluoreszenzen zeigen (A) Färbung der Mitochondrien durch MitoTrackerTM, (B, D) Nachweis von MOM-BiPro- Δ POP6 durch den monoklonalen Antikörper 4A6 und (C) endogenes Profilin I, detektiert durch ein Antiserum gegen Rinderprofilin. MOM-BiPro- Δ POP6 wird infolge des MOM-Sequenzmotivs an die Mitochondrien lokalisiert (A, B) und rekrutiert endogenes Profilin I (C, D). Maßstab: 10 μ m

13 Der Leuzin-Zipper beeinflusst im *Yeast two-hybrid* System die Interaktion zwischen p42POP und den Profilin-Isoformen nicht

Da die Interaktion von p42POP mit den Profilin-Isoformen I bzw. IIa und die Selbstassoziation von p42POP von dem gleichen Sequenzbereich vermittelt wird (AS 203 - 329), wurde der Einfluß des Leuzin-Zippers, der von den poly-L-Prolin Motiven P₅ und P₁₂ flankiert wird (siehe Abb. 4), auf die Interaktion mit Profilin I bzw. IIa untersucht. Die Hypothese, dass durch Dimerisierung von p42POP die Profilin-Bindungsstelle maskiert wird, wurde im *Yeast two-hybrid* System mit den bereits beschriebenen Leuzin-Zipper Mutanten überprüft. Der *S. cerevisiae* Stamm Y187 wurde dazu mit den für Profilin-kodierenden

Vektoren pGBKT7-Profilin I bzw. Profilin IIa und p42POP bzw. den verschiedenen Leuzin-Zipper Mutanten (L281A, L281P, L274A/L281A, L274P/L281P) cotransformiert und in Flüssigassays auf Interaktion getestet (Abb. 25).

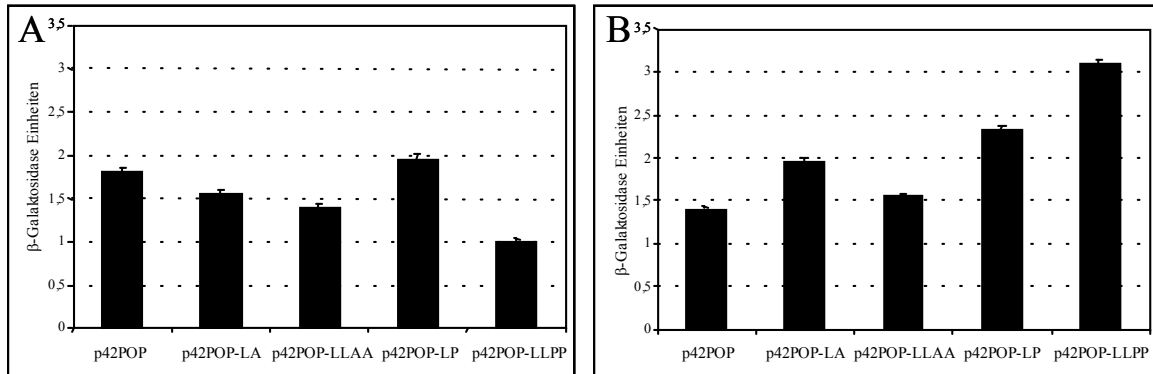


Abb. 25: Einfluß des Leuzin-Zippers von p42POP auf die Interaktion mit (A) Profilin I und (B) Profilin IIa. Die Interaktion wurde in einem *Yeast two-hybrid* Flüssigassay quantifiziert. Der Hefestamm Y187 wurde mit den Vektoren (A) pGBKT7-Profilin I bzw. (B) -Profilin IIa und verschiedenen p42POP Konstrukten cotransformiert. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert von vier unabhängigen β-Galaktosidase Aktivitätsmessungen, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Einfluß der Leuzin-Zipper Mutanten von p42POP auf die Interaktion mit Profilin I (Abb. 25A) oder Profilin IIa (Abb. 25B). Während Profilin I mit nahezu gleicher Affinität an das Wildtypprotein p42POP und die eingesetzten Mutanten bindet, interagiert Profilin IIa mit gleicher Intensität an das genuine Protein und p42POP L281A bzw. p42POP L274A/L281A, zeigte eine etwas höhere Affinität an die Prolin-Mutanten p42POP L281P bzw. p42POP L274P/L281P. Ob dies auf die Störung der amphipathischen α -Helix oder die Erweiterung der prolinreichen Region zurückzuführen ist, konnte in diesem System nicht geklärt werden.

14 Einfluß der potentiellen PKC-Phosphorylierungsstelle Threonin T273 auf die Interaktion von p42POP und Profilin

Die bereits beschriebene potentielle PKC-Phosphorylierungsstelle Threonin 273, die vermutlich regulatorischen Einfluß auf die Dimerisierung von p42POP nimmt, lokalisiert wie der dafür verantwortliche Leuzin-Zipper zwischen den poly-L-Prolin Motiven (siehe Abb. 4). Deshalb wurde die Bedeutung dieser Phosphorylierungsstelle auf die Interaktion zwischen

p42POP und Profilin in *Yeast two-hybrid* Flüssigassays untersucht. Die entsprechenden p42POP-Mutanten, p42POP-T273E, die durch Einführung einer sauren Aminosäure eine Phosphorylierung simulieren soll, und p42POP-T273V, die eine nicht phosphorylierbare Form darstellt, wurden mit den Vektoren pGBKT7-Profilin I bzw. pGBKT7-Profilin IIa in den Hefestamm Y187 cotransformiert und mit dem Bindungsverhalten des genuinen Proteins verglichen. Die erhaltenen β -Galaktosidase-Werte sind in Abbildung 26 im Vergleich zu p42POP dargestellt.

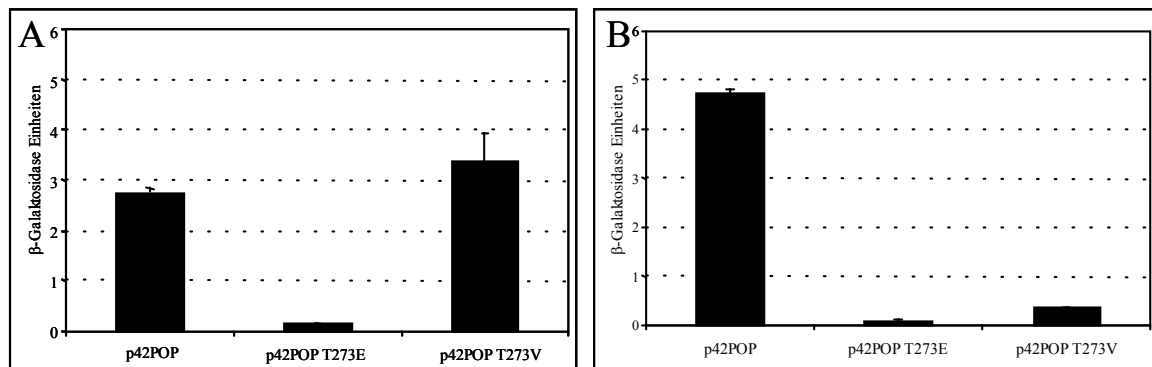


Abb. 26: Der Einfluß der Phosphorylierungsstelle T273 auf die Interaktion von p42POP mit (A) Profilin I und (B) Profilin IIa wurde in *Yeast two-hybrid* Flüssigassays analysiert. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert von vier unabhängigen β -Galaktosidase Aktivitätsmessungen, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Die Interaktion von p42POP scheint sowohl mit Profilin I (Abb. 26A) als auch mit Profilin IIa (Abb. 26B) durch die Einführung einer negativen Ladung an der Aminosäureposition 273 drastisch reduziert zu werden, wogegen zumindest bei Profilin I der Austausch des Threonins 273 durch Valin keinen Einfluß auf die Stärke der Wechselwirkung zu haben scheint. Um den dargestellten Einfluß der Mutationen, die den Leuzin-Zipper und die potentielle Phosphorylierungsstelle T273 innerhalb von p42POP betreffen, auf die Interaktion mit Profilin I biochemisch zu charakterisieren, wurden *chemical crosslinks* mit rekombinanten Proteinen durchgeführt. 25pmol bzw. 50pmol Maus Profilin I wurden mit 25pmol C-POP, C-POP LLPP oder C-POP T273E inkubiert und mittels des *crosslinkers* EDC/NHS quervernetzt (Abb. 27). Sowohl nicht mutiertes C-POP als auch die Leuzin-Zipper Mutante C-POP LLPP, die nicht mehr dimerisiert, binden an Profilin I, wobei letztere eine scheinbar höhere Affinität zu Profilin besitzt (Abb. 27). Den dargestellten Ergebnissen entsprechend, scheint Profilin an die monomere Form von p42POP zu binden. Dagegen inhibiert die Simulation einer Phosphorylierung durch die Einführung einer negativen Ladung an Threonin 273 von p42POP eine Interaktion mit Profilin. Ob es sich dabei tatsächlich um eine Phosphorylierungsstelle der PKC handelt, bedarf weiterer Analysen.

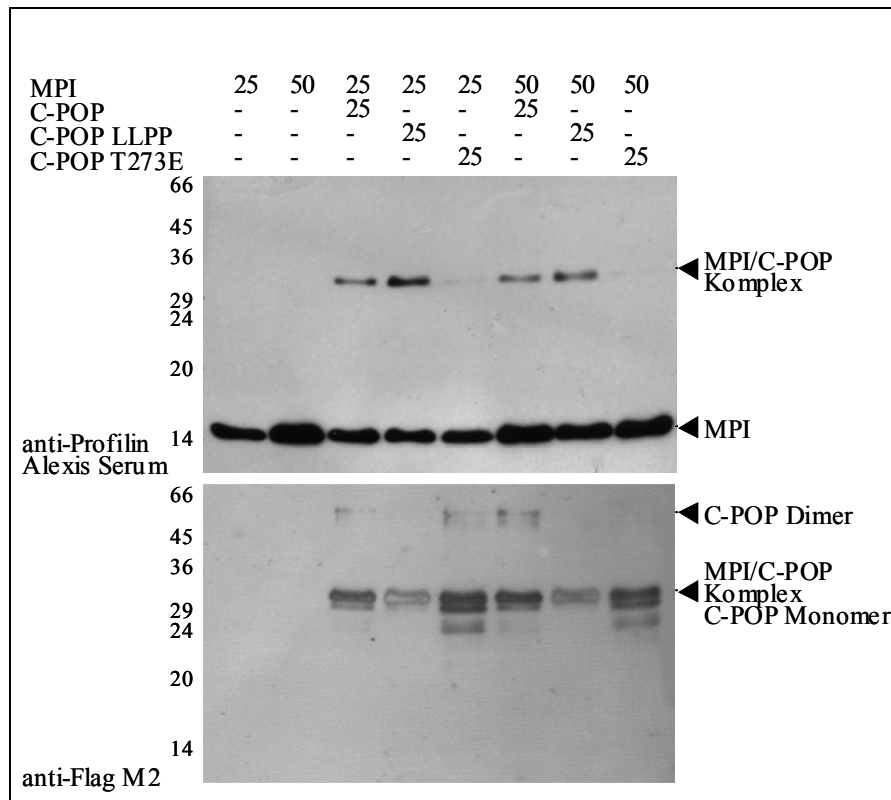


Abb. 27: *Chemical crosslinks* zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Mutationen von C-POP auf die Interaktion mit Maus Profilin I. Die angegebenen Mengen der aufgereinigten Proteine wurden mittels des *crosslinkers* EDC/NHS quervernetzt, durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunblot mit dem anti-Flag Antikörper M2 und einem polyklonalen anti-Profilin I Antiserum (Alexis) detektiert. Die Pfeile markieren monomeres Protein und quervernetzte Proteinkomplexe.

15 Regulation der Ligandenwechselwirkung und zellulären Funktion von Profilin durch Phosphorylierung

Die Bedeutung der Profileine bei dynamischen Prozessen der Aktinpolymerisation, sowie während Differenzierungs- und Proliferationsvorgängen wurden bereits beschrieben (siehe Einleitung). Durch seine Wechselwirkung mit sauren Phospholipiden stellt Profilin ein mögliches Bindeglied zwischen Signaltransduktion und Aktindynamik dar. Jedoch ist wenig über mögliche Regulationsmechanismen, die die Aktindynamik oder die Interaktion von Profilin mit poly-L-Prolin Liganden betrifft, bekannt. Die Identifizierung von Profilin I als PKC-Substrat (Hansson et al., 1988; Vemuri and Singh, 2001) und der Nachweis der PIP₂-stimulierten Phosphorylierung des Serin 138 (Singh et al., 1996) implizieren eine Regulation der Wechselwirkung von Profilin I mit prolinreichen Liganden, zumal diese Phosphorylierungsstelle innerhalb der Bindungsregion für poly-L-Prolin Liganden liegt (siehe

Abb. 1). Die Phosphorylierung als potentieller Regulationsmechanismus der Wechselwirkung zwischen Profilin und verschiedenen Liganden sollte einerseits im Hinblick auf eine mögliche Regulation der Interaktion zwischen p42POP und Profilin seitens des Profilins und andererseits auf die Funktion der Profileine im Zusammenspiel mit Aktin und ihrer prolinreichen Liganden in zellulären Prozessen, wie z.B. der Zelldynamik, der Differenzierung und Proliferation, untersucht werden. Verschiedene Proteinkinasen konnten beispielsweise als regulatorische Komponenten bei der Organisation der Zell-Matrix-Adhäsion identifiziert werden. Die α und δ Isoform der Proteinkinase C (PKC) sind in wachsenden fokalen Kontakten und fokalen Kontakten an Anheftungsstellen von Filopodien angereichert (Barry and Critchley, 1994; Jaken, 1996; Jaken et al., 1989; Woods and Couchman, 1992). Die Phosphorylierung von VASP, einem prolinreichen Profilin-Liganden, durch die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) inhibiert dessen Wechselwirkung mit Aktin und so die Funktion als Nukleator der Aktinpolymerisation (Harbeck et al., 2000; Walders-Harbeck et al., 2002).

16 Maus Profilin IIa ist ein Substrat der Proteinkinase C α (PKC α)

Ausgehend von der identifizierten Phosphorylierungsstelle Serin 138 in Profilin I wurden Sequenzhomologievergleiche zwischen den Profilin-Isoformen I und IIa unterschiedlicher Spezies (Abb. 28A) und Datenbankrecherchen durchgeführt. Verschiedene PKC-abhängige Phosphorylierungsstellen, darunter auch Serin 138, konnten in Maus Profilin IIa identifiziert werden und folglich wurde rekombinantes Maus Profilin IIa unter verschiedenen Bedingungen mit PKC α *in vitro* phosphoryliert (Abb. 28B). Um den Einfluß verschiedener Phospholipide zu untersuchen, wurde rekombinantes Maus Profilin IIa ohne Lipide, in Gegenwart von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) oder Phosphatidylserin (PS) mit PKC α *in vitro* phosphoryliert. Zudem wurde eine Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung analog zu den Bedingungen, die für Profilin I beschrieben wurden, in Anwesenheit von PIP₂ untersucht. Die einzelnen Ansätze wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mittels Autoradiographie analysiert (Abb. 28B).

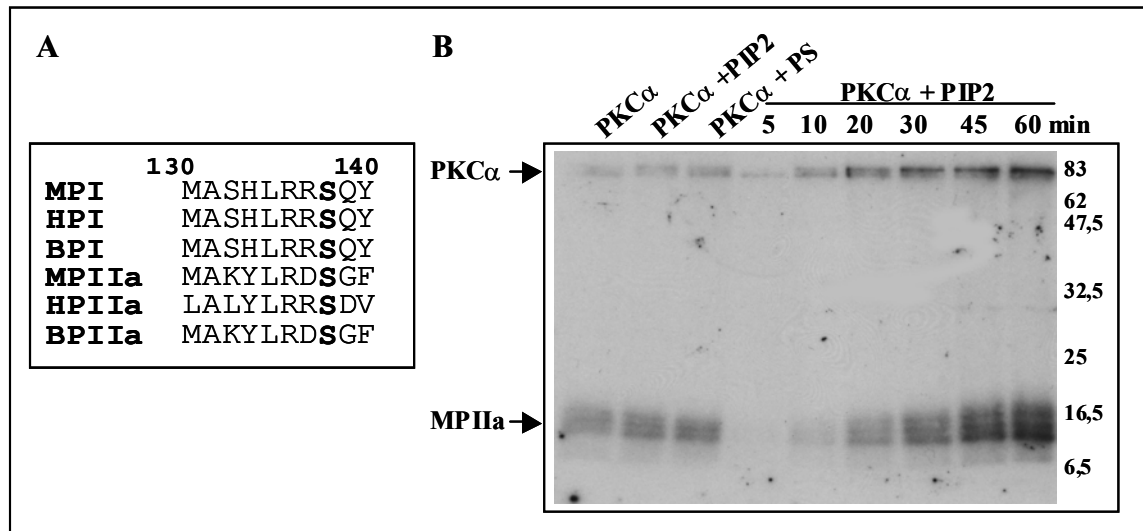


Abb. 28: *In vitro* Phosphorylierung von Profilin IIa durch PKC α . (A) Sequenzvergleich von Profilin I und IIa aus unterschiedlichen Spezies (M: Maus; B: Rind; H: Mensch) (B) Phosphorylierung von MPIIa unter den angegebenen Bedingungen. Die Analyse erfolgte mittels Auftrennung durch SDS-PAGE, Transfer auf Nitrozellulose und anschließender Autoradiographie.

Die im Autoradiogramm ersichtlichen Banden lassen, im Gegensatz zu Rinder-Profilin I (Hansson et al., 1988; Singh et al., 1996), auf mindestens drei PKC α -Phosphorylierungsstellen in Profilin IIa schließen (Abb. 28B). Das unterschiedliche Laufverhalten ist auf die Modifikation des Proteins infolge der Phosphorylierung zurückzuführen. Die für Profilin I beschriebene PIP₂-abhängige Phosphorylierung (Hansson et al., 1988; Singh et al., 1996) konnte für Profilin IIa nicht bestätigt werden. Sowohl in Abwesenheit von Lipiden, als auch in Gegenwart von PIP₂ oder PS war eine Phosphorylierung von Profilin IIa in der Autoradiographie nachweisbar (Abb. 28B), die beim Ansatz ohne Lipide im Vergleich zu den anderen gewählten Bedingungen etwas schwächer erschien. Um den Einfluß der unterschiedlichen Bedingungen exakt bestimmen zu können, müsste deren Phosphorylierungsrate jedoch quantifiziert werden. Die zeitabhängige Phosphorylierung zeigte eine über den gewählten Bereich von 5 min bis 60 min stetige Zunahme an phosphoryliertem Profilin IIa und an autophosphorylierter PKC α (Abb. 28B).

17 Die Interaktion zwischen Maus Profilin I bzw. IIa mit PKC α wird durch Lipide moduliert

Da Profilin I und IIa Substrate der PKC sind, wurde eine physikalische Interaktion der Proteine in *dot overlay* Experimenten näher untersucht. Da sowohl Profiline als auch PKC α an saure Phospholipide binden, wurde der Einfluß von sauren Phospholipiden auf die Wechselwirkung untersucht. 10pmol MPI, MPIIa und BSA wurden auf Nitrozellulose immobilisiert, mit verschiedenen [35 S]-Methionin markierten, *in vitro* translatierten PKC α -Fragmenten inkubiert und gebundenes Protein mittels Autoradiographie nachgewiesen. Der mögliche Einfluß von Phospholipiden auf die Interaktion wurde analysiert, indem einzelne Ansätze der Proteine vor Immobilisierung mit einem Lipidmix präinkubiert wurden. Eine für PKC-Interaktionen beschriebene Ca $^{2+}$ -Abhängigkeit, die ebenso von der regulatorischen Domäne vermittelt wird, wurde durch Inkubation *in vitro* translaterter PKC α in Anwesenheit von EGTA analysiert.

Die dargestellten Ergebnisse (Abb. 29) weisen auf eine Interaktion zwischen Profilin I bzw. IIa mit PKC α hin, die durch saure Phospholipide und freies Ca $^{2+}$ moduliert wird. Während in Anwesenheit von freiem Ca $^{2+}$ eine stärkere Bindung der PKC α an Profilin I bzw. Profilin IIa durch Präinkubation mit Lipiden erzielt werden konnte, wurde dieser Effekt durch die Zugabe von EGTA inhibiert (Abb. 29B). Interaktionsstudien mit Deletionsfragmenten der PKC α , die die regulatorische Domäne oder die katalytische Domäne inklusive des variablen Bereiches V3 umfaßten (Abb. 29A), wiesen auf unterschiedliche Aufgaben dieser Domänen hin. Die katalytische Domäne inklusive des variablen Bereiches V3 interagiert gleichermaßen mit Profilin und Lipid-präinkubiertem Profilin, wobei eine deutlich stärkere Affinität zu Profilin I im Vergleich zu Profilin IIa feststellbar war (Abb. 29B). Dagegen interagierte die katalytische Domäne der PKC α Lipid-abhängig mit Profilin. Sowohl für Profilin I, als auch für Profilin IIa konnte in Anwesenheit von Lipiden eine deutlich stärkere Bindung an die regulatorische Domäne der PKC α gezeigt werden. Eine schwache Interaktion konnte auch zwischen Lipid-präinkubiertem BSA und PKC α bzw. der regulatorischen Domäne nachgewiesen werden, stellt die für Profilin erhaltenen Resultate jedoch nicht in Frage.

Basierend auf den Ergebnissen ergibt sich eine Interaktion zwischen Profilin und PKC α , die sich aus einer Lipid-unabhängigen Wechselwirkung der katalytischen Domäne und einer durch die regulatorische Domäne vermittelten Ca $^{2+}$ - und Lipid-abhängigen Bindung zusammensetzt.

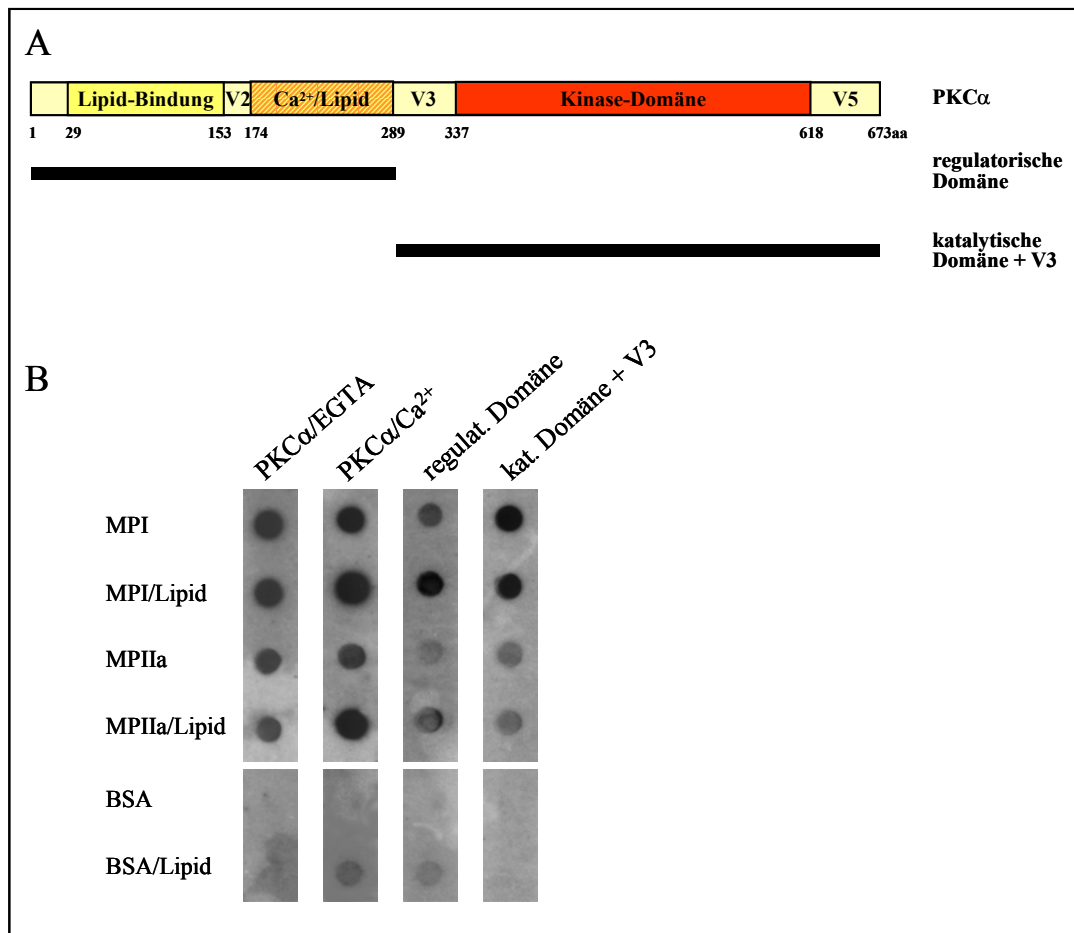


Abb. 29: Modulation der Interaktion zwischen PKC α und Profilin I und II α durch saure Phospholipide. (A) Darstellung der verschiedenen Domänen von PKC α und der eingesetzten Fragmente. (B) *dot overlay* Analysen zur Interaktion zwischen PKC α und MPI/II α . MPI, MPII α und BSA wurden - wo angegeben - mit Lipiden präinkubiert, auf Nitrozellulose immobilisiert und mit den angegebenen [³⁵S]-markierten Proteinen inkubiert. Die Ca²⁺-Abhängigkeit der Interaktion wurde durch Reduktion von freiem Ca²⁺ durch Zugabe von EGTA untersucht.

18 PKA-Phosphorylierung von Profilin I und II α

Weitere potentielle Phosphorylierungsstellen konnten in den Profilin-Isoformen I und II α mittels Datenbankrecherchen identifiziert werden. Insbesondere die Lokalisation der Phosphorylierungsstellen der cAMP abhängigen Serin/Threonin Proteinkinase (PKA) innerhalb der PIP₂- und G-Aktin- Bindungsdomäne von Profilin lassen eine Regulation dieser Interaktionen über transiente Phosphorylierungsvorgänge vermuten.

Zur Identifizierung potentieller Phosphorylierungsstellen wurden Profilin I und II α *in vitro* mit PKA phosphoryliert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und durch Autoradiographie analysiert (Abb. 30).

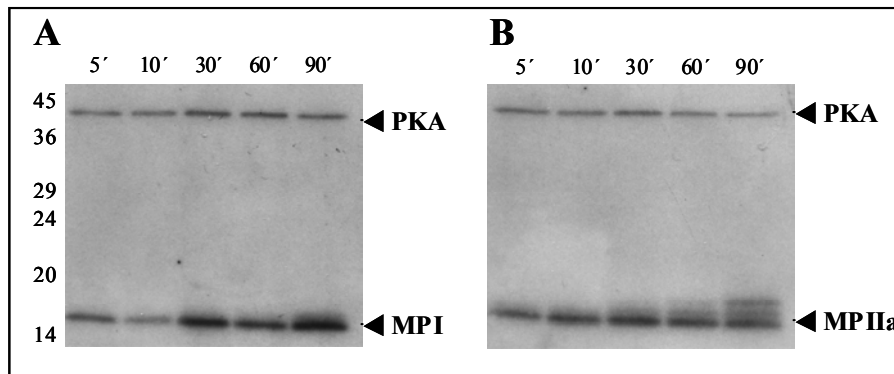


Abb. 30: *In vitro* Phosphorylierung von (A) Profilin I und (B) Profilin IIa durch die katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Protein Kinase PKA. Die Analyse erfolgte mittels Auftrennung durch SDS-PAGE, Transfer auf Nitrozellulose und anschließender Autoradiographie.

Sowohl Profilin I, als auch Profilin IIa stellen Substrate der PKA dar. Der Zeitverlauf der Phosphorylierung ergab für beide Profilin-Isoformen eine Zunahme der Phosphorylierungsrate über den gewählten Zeitbereich (Abb. 30). Aufgrund des Laufverhaltens der Proteine lassen sich in Profilin I zumindest zwei PKA-Phosphorylierungsstellen (Abb. 30A) vermuten. Die Kinetik der Phosphorylierung von Profilin IIa ergab nicht nur eine Zunahme der Phosphorylierungsrate, zudem konnten zusätzliche Banden infolge der PKA-Phosphorylierung im Autoradiogramm gezeigt werden. Bereits nach 10 minütiger Inkubation erfolgte eine Verschiebung zu höherem Molekulargewicht, nach 60 Minuten Inkubation war eine weitere Bande in der Autoradiographie ersichtlich (Abb. 30B). Diese Ergebnisse deuten auf drei potentielle Phosphorylierungsstellen innerhalb von Profilin IIa hin, die in zeitlicher Abfolge durch die cAMP-abhängige Proteinkinase modifiziert werden.

19 Simulation der Phosphorylierung von Serin138 in Profilin I bzw. IIa inhibiert die Interaktion mit poly-L-Prolin und prolinreichen Liganden

Um den Einfluß der PKC α -Phosphorylierungsstelle Serin 138 in Profilin I (Singh et al., 1996) und der potentiellen Phosphorylierung von Serin 138 in Profilin IIa auf die Interaktion mit poly-L-Prolin Peptiden oder prolinreichen Liganden zu untersuchen, wurden Mutanten generiert, die durch Einführung einer sauren Ladung eine Phosphorylierung simulieren (S138D) bzw. eine Phosphorylierung inhibieren (S138A). Zur Analyse dieser Mutanten wurden Präzipitationen mit poly-L-Prolin-Sepharose durchgeführt. HeLa Zellen wurden

transient mit Flag-tag-fusioniertem MPI, MPI S138A bzw. MPI S138D, MPIIa, MPIIa S138A oder MPIIa S138D transfiziert, hypotonisch lysiert und die verschiedenen Profilin-Mutanten durch Präzipitation auf ihre Bindungsfähigkeit an poly-L-Prolin-Sepharose analysiert (Abb. 31). Nach mehrmaligem Waschen wurde an poly-L-Prolin-Sepharose gebundenes Protein durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mittels des anti-Flag Antikörper M2 detektiert.

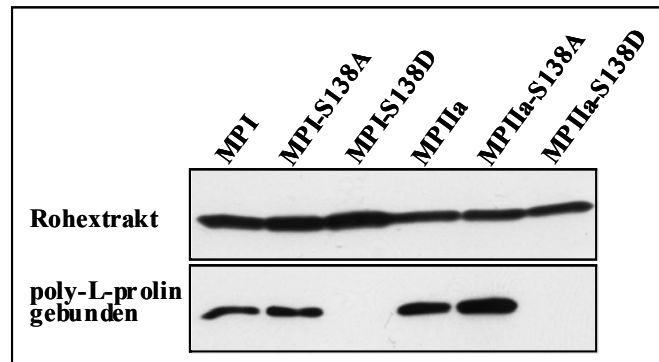


Abb. 31: Einfluß der Simulation einer Phosphorylierung von Serin138 in MPI und MPIIa auf die Wechselwirkung mit poly-L-Prolin. Die angegebenen Profilin-Konstrukte wurden transient in HeLa Zellen exprimiert. Nach hypotoner Lyse erfolgte eine Präzipitation mit poly-L-Prolin-Sepharose. Die Detektion von exogenem Protein im Rohextrakt und gebundenem Protein erfolgte mit dem anti-Flag Antikörper M2.

Die Untersuchungen zur Wechselwirkung der Profilin-Mutanten mit poly-L-Prolin zeigen, dass die Simulation der Phosphorylierung durch Einführung einer negativen Ladung an Position 138 in Profilin I und IIa die Interaktion inhibieren, während genuines Profilin und S138A-Mutanten in ihren Bindungseigenschaften an poly-L-Prolin nicht beeinträchtigt waren. Zur weiteren Charakterisierung der Profilin-Mutanten wurden Untersuchungen im *Yeast two-hybrid* System mit verschiedenen Profilin-Liganden durchgeführt. Deren Interaktion mit den prolinreichen Profilin-Liganden SMN und p42POP, β -Aktin als Positivkontrolle und der EVH1-Domäne von VASP als Negativkontrolle wurde in *Yeast two-hybrid* Flüssigassays analysiert (Abb. 32). Dazu wurde der *S. cerevisiae* Stamm Y187 mit den entsprechenden Konstrukten in den Vektoren pGADT7 bzw. pGBKT7 cotransformiert. Die dargestellten Ergebnisse untermauern die in den poly-L-Prolin Präzipitationen erhaltenen Befunde. Die Simulation der Phosphorylierung der Aminosäure Serin 138 inhibiert die Wechselwirkung mit den prolinreichen Liganden p42POP (Abb. 32A) und SMN (Abb. 32B) und nimmt keinen Einfluß auf die Interaktion der Profileine mit β -Aktin, die durch eine andere Domäne der Profilin-Isoformen bewirkt wird (Abb. 32C). Die Mutationen MPI S138A bzw. MPIIa S138A

nehmen dagegen keinen Einfluß auf die Interaktion mit den prolinreichen Liganden p42POP und SMN, sowie β -Aktin. Die als Negativkontrolle eingesetzte EVH1-Domäne von VASP zeigte mit keinem der Profilin-Konstrukte eine Interaktion (Abb. 32C).

Die erzielten Ergebnisse weisen auf einen signifikanten Einfluß der Phosphorylierungsstelle Serin 138 auf das Bindungsverhalten der Profilin-Isoformen I und IIa an prolinreiche Liganden, sowie poly-L-Prolin Sepharose hin. Die Störung der hydrophoben Region, die die Interaktion mit poly-L-Prolin Motiven vermittelt, infolge der Einführung einer negativ geladenen Aminosäure stellt einen möglichen Regulationsmechanismus zellulärer prolinreicher Profilin-Liganden dar.

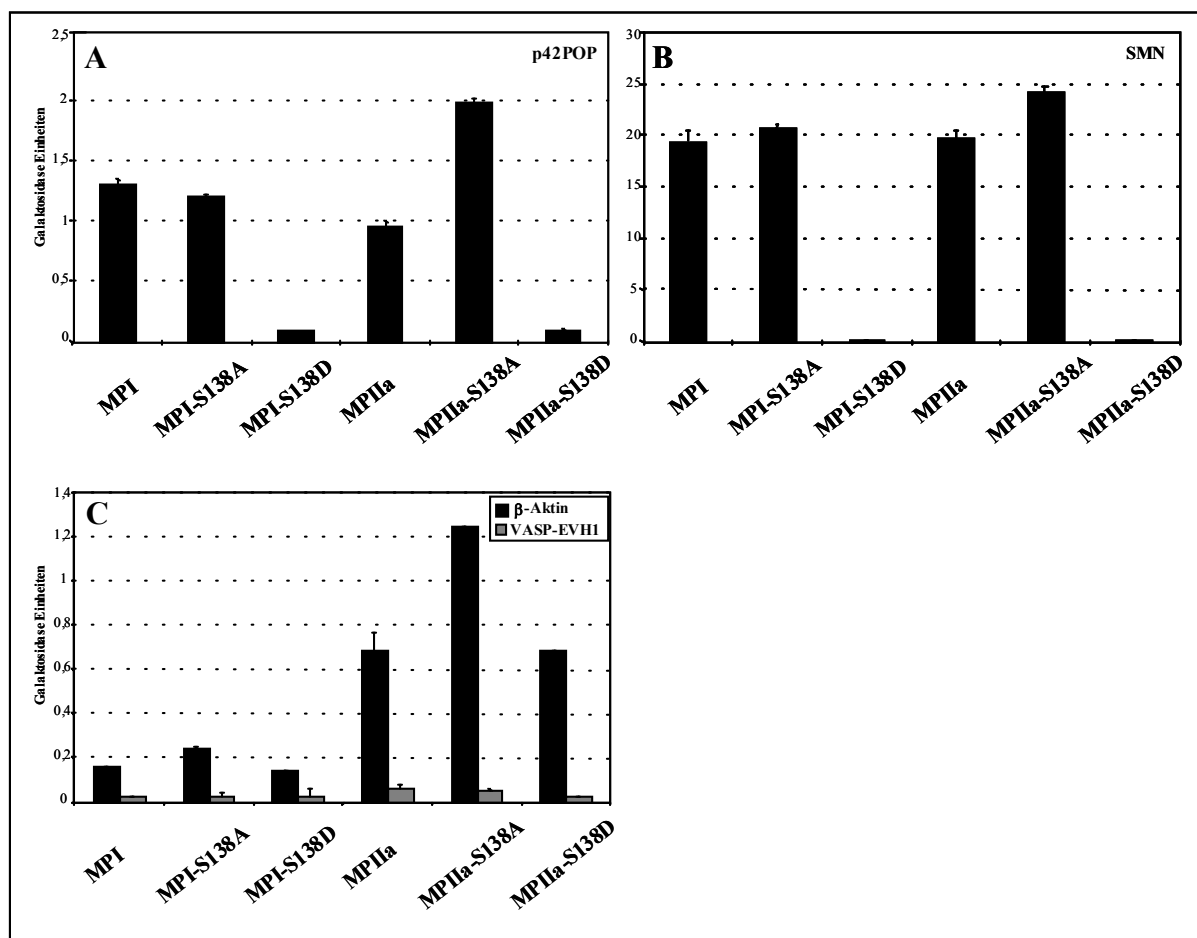


Abb. 32: Einfluß der Simulation einer Phosphorylierung von Serin 138 in MPI und MPIIa auf die Wechselwirkung mit verschiedenen Liganden im *Yeast two-hybrid* Flüssigassay. Die angegebenen Profilin-Konstrukte wurden auf Interaktion mit (A) p42POP, (B) SMN und (C) β -Aktin bzw. der EVH1-Domäne von VASP untersucht. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert von vier unabhängigen β -Galaktosidase Aktivitätsmessungen, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

20 In vitro phosphoryliertes Profilin I und IIa unterscheiden sich in ihrer poly-L-Prolin Bindung

Zur Charakterisierung des Einflusses der Phosphorylierungsstelle Serin 138 wurden Profilin I bzw. IIa *in vitro* mit PKC α phosphoryliert und ihr Bindungsverhalten an poly-L-Prolin analysiert (Abb. 33A). Zusätzlich wurde der Effekt einer Phosphorylierung von Profilin I und IIa durch PKA (Abb. 33B) auf die Wechselwirkung mit poly-L-Prolin mittels poly-L-Prolin-Sepharose Präzipitation untersucht. Jeweils 100pmol rekombinantes Protein wurde für 60min mit den Serin/Threonin Kinasen PKC α bzw. PKA phosphoryliert und anschließend für 90min mit poly-L-Prolin-Sepharose inkubiert. Gebundenes und nicht sedimentiertes Protein wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und das [32 P]-phosphorylierte Protein mittels Autoradiographie nachgewiesen.

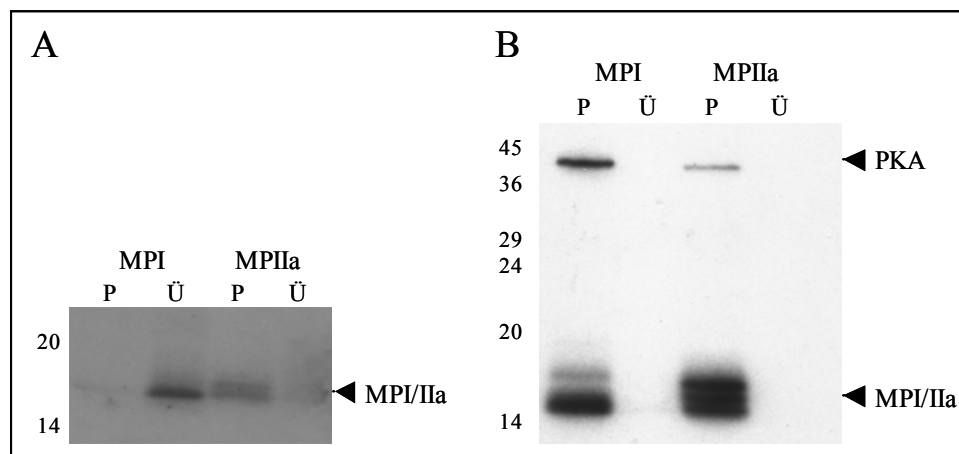


Abb. 33: Präzipitation von *in vitro* phosphoryliertem Profilin mit poly-L-Prolin- Sepharose. MPI bzw. MPIIa wurden mit (A) PKC α oder (B) PKA phosphoryliert, mit poly-L-Prolin-Sepharose inkubiert und gebundenes (P) bzw. nicht gebundenes Protein (Ü) durch Autoradiographie detektiert.

Die in Abbildung 33 dargestellten Ergebnisse unterstützen, zumindest im Fall von Profilin I, die mit den Mutanten erzielten Resultate (Abb. 31 und 32). Die Phosphorylierung von Serin 138 des Profilin I durch PKC α inhibiert die Interaktion mit poly-L-Prolin und stellt einen möglichen Regulationsmechanismus für die Interaktion zwischen Profilin I und prolinreichen Liganden dar. Dagegen zeigt die Phosphorylierung von Profilin IIa durch PKC α ebenso keinen Einfluß auf die Wechselwirkung mit poly-L-Prolin-Sepharose wie die Phosphorylierung von Profilin I und IIa durch PKA. Phosphoryliertes Protein lag bei diesen Ansätzen ausschließlich an poly-L-Prolin-Sepharose gebunden vor (Abb. 33). Die

Präzipitation von Profilin I durch PKA ergab, im Gegensatz zur durchgeführten Kinetik, bei der zwei Banden aufgetreten sind (siehe Abb. 30A), insgesamt drei Banden im Autoradiogramm, die analog zu Profilin IIa, auf drei PKA-Phosphorylierungsstellen in Profilin I schließen lassen (Abb. 33B). Zudem konnte autophosphorylierte PKA sedimentiert werden, was auf eine mögliche Interaktion zwischen Profilin und PKA hindeutet. Die Spezifität der Interaktion zwischen der PKA und den Profilin-Isoformen muß jedoch noch eingehender analysiert werden. Um eine potentielle Funktion der Phosphorylierung von Profilin IIa durch PKC α und beider Profilin-Isoformen durch PKA zu erhalten, sind weitere Untersuchungen, die auch die Identifizierung der potentiellen Phosphorylierungsstellen umfassen, notwendig.

21 In vitro Phosphorylierung von Profilin I und IIa durch PKA inhibiert die Interaktion mit Aktin

Da die Phosphorylierung von Profilin I und IIa durch PKA die Wechselwirkung mit poly-L-Prolin nicht beeinflußt (siehe Abb. 33B) und potentielle PKA-Phosphorylierungsstellen innerhalb der Aktin-Bindungsdomäne von Profilin durch Datenbankanalysen identifiziert werden konnten, wurde der Einfluß einer PKA-Phosphorylierung auf die Interaktion zwischen Profilin und Aktin untersucht. 50pmol Profilin I bzw. IIa wurden *in vitro* durch die katalytische Untereinheit der PKA phosphoryliert, die Phosphorylierung durch Zugabe des PKA-Inhibitors PKI nach 90min gestoppt und die Proteine in Anwesenheit von 50pmol Aktin bzw. ohne Aktin für 60min mit dem *crosslinker* EDC/NHS inkubiert. Anschließend wurden die Proteinkomplexe gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und durch Autoradiographie (Abb. 34A) und mit polyklonalen Antiseren gegen Profilin I und IIa (Abb. 34B) analysiert.

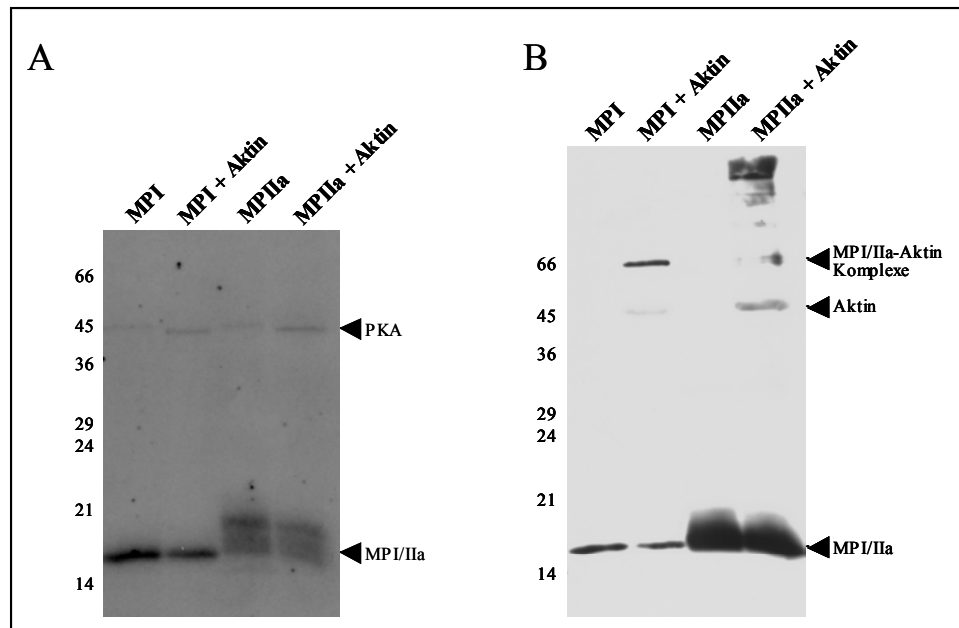


Abb. 34: Einfluß der PKA-Phosphorylierung von Profilin auf die Interaktion mit Aktin. *Crosslinks* von *in vitro* phosphoryliertem Profilin mit oder ohne Aktin. Die Detektion der Proteinkomplexe erfolgte durch Autoradiographie (A) oder anti-Profilin Antiseren (B).

Weder *in vitro* durch PKA phosphoryliertes Profilin I, noch Profilin IIa konnte in Komplexen mit Aktin im Autoradiogramm nachgewiesen werden (Abb. 34A). Dagegen konnten bei entsprechenden Ansätzen durch polyklonale anti-Profilin Antiseren Aktin-Profilin-Komplexe detektiert werden (Abb. 34B). Bei *crosslinks* ohne Aktin konnten keine Proteinkomplexe mit dem entsprechenden Molekulargewicht detektiert werden, wodurch bestätigt wurde, dass es sich bei den über Antikörper nachgewiesenen Komplexen tatsächlich um Profilin-Aktin-Komplexe handelt. Die Phosphorylierung beider Profilin-Isoformen inhibiert nach den dargestellten Ergebnissen (Abb. 34) offensichtlich die Interaktion mit Aktin und stellt einen möglichen zellulären Regulationsmechanismus zur transienten Inhibition der Wechselwirkung zwischen Aktin und Profilin dar.

IV DISKUSSION

Die dynamische Struktur des Mikrofilamentsystems basiert auf dem Zusammenspiel struktureller und regulatorischer Komponenten. Diese cytoplasmatischen Funktionen entsprechender Proteine bei Prozessen der Aktindynamik wurden bisher detailliert beschrieben. Die steigende Anzahl verschiedener cytoskelettaler Proteine, die im Zellkern nachgewiesen werden konnten, lassen Spekulationen über mögliche Funktionen im Zellkern zu, die unabhängig von cytoplasmatischen Aufgaben sind. Aktin, dessen „eigentliche“ Funktion in Prozessen, die u.a. Zellmorphologie und Zellmotilität betreffen, verstanden wird, konnte nicht nur in Zellkernen mehreren Zelllinien identifiziert werden, verschiedene Ergebnisse weisen zudem auf eine mögliche Funktion von nukleärem Aktin in Prozessen der Genregulation hin. Eine Interaktion zwischen Aktin und DNA wurde mittels *in vivo crosslinking* (Miller et al., 1991) und eine Lokalisation von Aktin in Bereichen hoher Transkriptionsaktivität in Lampenbürstenchromosomen (Scheer et al., 1984) nachgewiesen. Zudem konnte durch die Bindung von Aktin an die RNA-Polymerase II eine direkte Verbindung zur basalen Transkriptionsmaschinerie hergestellt werden (Smith et al., 1979; Weaver, 1976). Desweiteren zeigten Burke und Mitarbeiter eine direkte Verbindung zwischen dem Aktincytoskelett und der Genexpression des *Respiratory Syncytial Virus* RSV (Burke et al., 1998; Burke et al., 2000). Die Transkription des RSV Genoms wies dabei nicht nur eine direkte Abhängigkeit von Aktin auf, zudem wirkte das G-Aktin-bindende Profilin modulierend auf die Transkriptionsrate. Die Identifizierung von p42POP als Profilin-Ligand und seine Homologie zu Transkriptionsfaktoren der Myb-Familie stellt eine mögliche Verbindung zwischen dem Mikrofilamentsystem und der Genregulation her und könnte auf eine neue zelluläre Funktion des Profilins deuten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene, durch Datenbankanalysen identifizierte Domänen von p42POP charakterisiert und durch die Charakterisierung und Identifizierung der Bindungsmotive in p42POP für Profilin und G-Aktin eine Verbindung zu cytoskelettalen Proteinen hergestellt.

1 Identifizierung von p42POP als funktioneller Transkriptionsfaktor der Myb-Familie

Myb-verwandte Proteine wurden in verschiedenen Spezies (Säuger, Insekten, Hefen und Pflanzen) identifiziert (Baranowskij et al., 1994; Katzen et al., 1985; Klempnauer et al., 1983; Marocco et al., 1989; Nomura et al., 1988; Paz-Ares et al., 1987; Tice-Baldwin et al., 1989). Charakteristisch für diese Proteine ist eine konservierte Region in ihrem N-Terminus, die die DNA-Bindung vermittelt. Durch Datenbankrecherchen konnte ein Homologiebereich im N-Terminus von p42POP zur DNA-Bindungsdomäne von Proteinen der Myb-Familie identifiziert werden. Im Gegensatz zu bisher bekannten Mitgliedern dieser Proteinfamilie in Vertebraten besteht die in p42POP enthaltene DNA-Bindungsdomäne aus einem einzigen *Myb-repeat*. Zudem ist der erste der konservierten Tryptophanreste durch ein Phenylalanin ersetzt, ein Austausch, der bereits für pflanzliche, funktionelle Myb-Proteine beschrieben wurde. Neben den Tryptophan- bzw. Phenylalaninresten beinhaltet die potentielle Myb-Domäne in p42POP auch weitere konservierte Aminosäuren. Hydrophobe Aminosäuren, die bei der Ausbildung der Helix-turn-Helix Struktur von Bedeutung sind, sowie basische Aminosäuren, die vermutlich in die direkte Interaktion mit DNA involviert sind, sind auch in p42POP enthalten. Mittels Sekundärstrukturanalysen wurden in der DNA-Bindungsdomäne von p42POP helikale Bereiche identifiziert, die das für die einzelnen *repeats* charakteristische Helix-turn-Helix Motiv (Frampton et al., 1991; Gabrielsen et al., 1991; Ogata et al., 1994) ausbilden können. Die Funktionalität der Myb-Domäne in p42POP wurde durch EMSA-Studien gezeigt, in denen eine Bindung von p42POP an das Konsensus DNA-Erkennungsmotiv der Myb-Proteine (PyAACG/TG; Biedenkapp et al., 1988) und die Spezifität dieser Interaktion durch Kompetitionsassays nachgewiesen wurde. Zur näheren Charakterisierung der DNA-bindenden Domäne als *Myb-repeat* wurden zielgerichtete Mutagenesen durchgeführt. Da die DNA-Bindung von c-Myb durch Phosphorylierung der Serinreste 11 und 12 durch die Caseinkinase II (CK-II) inhibiert wird (Luscher et al., 1990), wurde eine potentielle Phosphorylierungsstelle (Serin 25) innerhalb der DNA-bindenden Domäne mutiert und durch die Einführung einer negativen Ladung (S25D) nicht nur eine Phosphorylierung simuliert, sondern zudem der hydrophobe Charakter in der Umgebung des erwähnten Phenylalanins gestört. Diese Mutation inhibierte die Bindung von p42POP an DNA ebenso wie die Mutation R83E/W84P, durch die zwei konservierte Aminosäurereste in der Konsensussequenz der *Myb-repeats* geändert wurden. Durch den Nachweis der Interaktion des N-terminalen p42POP-Fragmentes N-POP mit DNA, das im Gegensatz zum

gesamten Protein nicht in der Lage ist zu dimerisieren, wurde zudem gezeigt, dass die DNA-Bindung von der monomeren Form von p42POP vermittelt wird.

Neben der Homologie zur DNA-bindenden Domäne weist p42POP zudem Ähnlichkeiten im modularem Aufbau zu dem Transkriptionsfaktor c-Myb auf. Anschließend an die DNA-bindende Domäne befindet sich eine saure Region und im C-terminalen Bereich beider Proteine ist ein Leuzin-Zipper ähnliches Motiv lokalisiert. Dem sauren Bereich wurde, wie auch für andere Myb-Proteine gezeigt (Kalkbrenner et al., 1990; Sakura et al., 1989), eine transkriptionsaktivierende Funktion zugewiesen, die durch C-terminale Bereiche von p42POP negativ reguliert wird. Derartige, regulatorische Domänen konnten auch in A-, B- und c-Myb identifiziert werden. Im Fall von c-Myb konnte eine negative Autoregulation der DNA-Bindung und der transkriptionellen Aktivität u.a. auf die Ausbildung von Homodimeren, die durch einen Leuzin-Zipper vermittelt wird, zurückgeführt werden (Nomura et al., 1993). Analog zu c-Myb wurde eine Dimerisierung von p42POP mittels Mutationsanalysen auf das Leuzin-Zipper Motiv zurückgeführt, die eindeutig belegten, dass der amphipathische Charakter der α -Helix, in der der Leuzin-Zipper lokalisiert ist, allein nicht für die Selbstassoziation ausreichend ist. Zudem konnte ein regulatorischer Einfluß der Selbstassoziation auf die transkriptionelle Aktivität gezeigt werden. Der relativ schwache Anstieg der Transaktivierung infolge der Mutation des Leuzin-Zippers im Vergleich zum genuinen Protein (ca. 1,9-fach stärkere Aktivierung) und zur Steigerung der Aktivierung durch Δ POP4 (bis zu 9-fach im Vergleich zu p42POP) weist auf weitere regulatorische Elemente im C-terminalen Bereich hin. Ein ähnlicher Effekt ist auch für c-Myb beschrieben worden. Eine Inhibierung der Dimerisierung durch Mutationen innerhalb des Leuzin-Zippers induzierten einen relativ geringen Anstieg der Transaktivierung (3-fache Induktion verglichen zum genuinen c-Myb; Kanei-Ishii et al., 1992). Weitere modulierende Motive konnten im C-Terminus von c-Myb mit der Phosphorylierungsstelle Serin 528 und Bindungsstellen von regulatorisch wirkenden Proteinen identifiziert werden.

Die Tatsache, dass ein verkürztes Fragment von p42POP ausreichend für die Interaktion mit DNA ist und der N-Terminus zudem stärker transaktivierend wirkt, legt den Schluß nahe, dass p42POP als Monomer an DNA bindet und die Transaktivierung durch C-terminale Bereiche reguliert wird. Eine Regulation könnte über die Dimerisierung via des Leuzin-Zippers erfolgen, durch die p42POP in einer transkriptionell inaktiven Form vorliegt (Abb. 35). Die Dissoziation von p42POP-Dimeren und eine dadurch induzierte Aktivierung von p42POP könnte durch Phosphorylierung oder Liganden reguliert werden, die p42POP als Monomer stabilisieren. Die angewandten Methoden konnten den Einfluß der Phosphorylierung der

potentiellen PKC-Phosphorylierungsstelle Threonin 273 auf die Dimerisierung von p42POP nicht eindeutig klären, jedoch ist eine Regulation der transkriptionellen Aktivität durch diese Modifikation nicht auszuschließen.

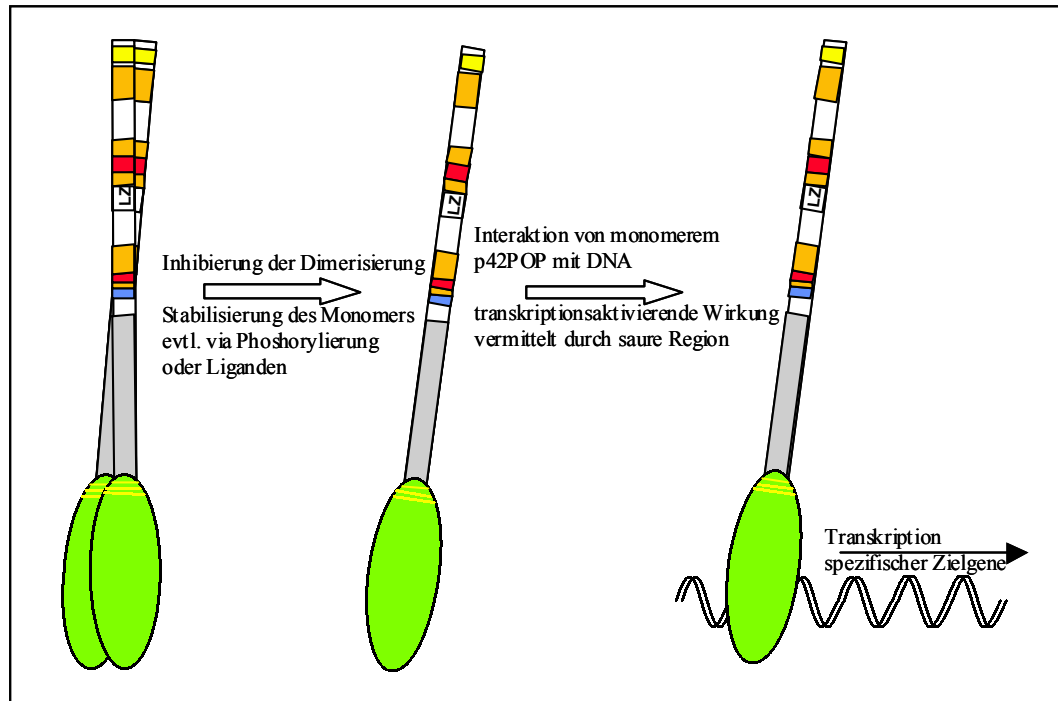


Abb. 35: Modell zur Regulation der transkriptionellen Aktivität von p42POP. Aufgrund der durch den Leuzin-Zipper vermittelten Dimerisierung liegt p42POP in einer inaktiven Form vor. Durch externe Stimuli, möglicherweise infolge von Phosphorylierung oder Ligandeninteraktion, wird eine Selbstassoziation inhibiert und eine DNA-Bindung durch die Myb-Domäne von p42POP induziert. Vermittelt durch die saure Region erfolgt die Transkription entsprechender Zielgene.

Die Charakterisierung der DNA-bindenden Domäne und der transkriptionsaktivierenden Region zeigten, dass es sich bei p42POP nicht nur um einen Transkriptionsfaktor der Myb-Familie, sondern zudem um das erste funktionelle Myb-Protein aus Vertebraten handelt, dessen DNA-bindende Aktivität von einem einzigen Myb-repeat vermittelt wird.

Unterstützt wird die potentielle Funktion von p42POP als Transkriptionsfaktor durch seine Lokalisation im Zellkern, die durch zwei Kernimportsignale vermittelt wird. Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der Myb-Transkriptionsfaktoren besitzt p42POP zudem ein funktionelles Kernexportsignal, wodurch eine mögliche cytoplasmatische Funktion nicht ausgeschlossen werden kann. Entsprechend könnten über Ligandenwechselwirkung im Cytoplasma Stimuli zur Regulation der Transkription spezifischer Zielgene in den Zellkern gelangen.

2 Wechselwirkung von p42POP mit den cytoskelettalen Proteinen Profilin und G-Aktin

p42POP wurde ursprünglich als Profilin-Ligand im *Yeast two-hybrid* System identifiziert (Marquardt, 1998). In unterschiedlichen Studien konnte im Rahmen dieser Arbeit die Bindungsregion innerhalb von p42POP auf den Aminosäurenbereich 204 – 329 eingegrenzt und die Interaktion beider Proteine auch *in vivo* bestätigt werden. In der entsprechenden Region von p42POP sind zwei poly-L-Prolin Motive (P₅ und P₁₂) lokalisiert, wobei das P₁₂-Motiv ausreichend für eine Interaktion mit Profilin ist. Während Peptide aus sechs Prolinresten nur eine schwache Wechselwirkung mit Profilin zeigen, findet eine effiziente Bindung für Peptide, die mehr als acht Proline umfassen, an Profilin statt (Domke et al., 1997; Petrella et al., 1996). Interaktionsstudien im *Yeast two-hybrid* System und *crosslink* Experimente weisen zudem auf eine Bindung von Profilin an die monomere Form von p42POP hin. Insbesondere die *crosslink* Experimente, bei denen eine stärkere Wechselwirkung von C-POP LLPP im Vergleich zum genuine C-POP mit Profilin nachgewiesen werden konnte, lassen Spekulationen über eine mögliche Funktion von Profilin bei der Regulation der transkriptionellen Aktivität von p42POP zu. Durch die Bindung an Profilin könnte p42POP in die monomere Form gebracht oder in dieser stabilisiert werden und somit transkriptionell aktiv vorliegen. Diese Aktivierung könnte über die potentielle PKC α -Phosphorylierungsstelle Threonin 273 reguliert werden, da die Simulation einer Phosphorylierung durch die Einführung einer negativen Ladung (C-POP T273E) sowohl im *Yeast two-hybrid* System, als auch in *crosslink* Experimenten die Interaktion mit Profilin inhibiert. In diesem Zusammenhang könnte auch die Phosphorylierung von Profilin I an Serin 138 durch PKC (Singh et al., 1996) eine Rolle spielen. Interaktionsstudien mit Mutanten, die eine Phosphorylierung simulieren (Profilin I S138D), zeigen ein nahezu vollständig reduziertes Bindungsverhalten an prolinreiche Liganden (SMN, p42POP) und poly-L-Prolin, während die Einführung eines Alanins zur Generierung einer nicht-phosphorylierbaren Mutante (Profilin I S138A) keinen Einfluß auf die Ligandeninteraktion nimmt. Der Einfluß dieser Phosphorylierungsstelle konnte mittels Phosphorylierungsanalysen für Profilin I bestätigt werden. Entsprechend könnte eine transiente, lokale Phosphorylierung des Serins 138 in Profilin I, die sowohl im Cytoplasma, als auch im Zellkern stattfinden kann, Einfluß auf die Interaktion mit p42POP und somit auf dessen transkriptionelle Aktivität nehmen.

Eine derartige modulierende Wirkung wurde für Profilin bei der Genexpression des *Respiratory Syncytial Virus* RSV (Burke et al., 2000) nachgewiesen. Mittels Kompetitionsanalysen konnte durch Inhibition der Wechselwirkung mit prolinreichen

Liganden die Transkriptionsrate um 60–80% reduziert werden (Burke et al., 2000). p42POP könnte in diesem Zusammenhang eine mögliche Verbindung zwischen Profilin und Transkriptionsereignissen herstellen. Burke und Mitarbeiter zeigten neben dem modulierenden Einfluß von Profilin durch die direkte Abhängigkeit der Transkription des RSV Genoms von Aktin eine Verbindung zwischen dem Aktincytoskelett und der Genexpression des *Respiratory Syncytial Virus* (Burke et al., 1998; Burke et al., 2000). Die bereits dargestellten Ergebnisse implizieren eine Funktion von Aktin im Zellkern. Nukleäres Aktin lokalisiert zum einen an Bereichen hoher Transkriptionsaktivität und steht durch die Bindung an die RNA-Polymerase II in direktem Zusammenhang mit der Transkriptionsmaschinerie. Zudem konnte ein regulatorischer Einfluß von Aktin auf die Transkription spezifischer Zielgene gezeigt werden. Durch Sequenzvergleiche wurde im N-terminalen Bereich von p42POP ein Thymosin β 4-ähnliches Aktinbindungsmotiv identifiziert. Strukturanalysen ergaben für den entsprechenden Aminosäurenbereich (Aminosäuren 77 bis 96) eine amphipathische α -Helix, die einen isoelektrischen Punkt von 10.4 aufweist und in der sich basische Aminosäuren in räumlicher Nähe befinden. Entsprechend könnte das Aktinbindungsmotiv eine basische Bindungsfläche für negativ geladene Bereiche auf der Aktinoberfläche darstellen. Mittels Mutationsanalysen konnte das potentielle Bindungsmotiv kartiert werden. Die Substitution basischer Aminosäuren durch saure Aminosäuren im N-terminalen Bereich von p42POP (N-POP K82E/R83E, N-POP R89E/R90E) reduzierte die Bindung an Aktin signifikant und bestätigte somit das identifizierte Thymosin β 4-ähnliche Aktinbindungsmotiv. Zudem konnte der Einfluß des hydrophoben Bereiches auf die Interaktion mit Aktin durch Einführung einer negativen Ladung (Mutation N-POP T91E) gezeigt werden, die die Aktinbindung des N-terminalen Fragmentes nahezu inhibierte. Dagegen hatte die Mutation T91A keine Auswirkung auf die Wechselwirkung. Die erzielten Resultate weisen in Analogie zu Thymosin β 4 (van Troys et al., 1996) auf ein konserviertes Aktinbindungsmotiv im N-terminalen Bereich von p42POP hin. Da sich die DNA-Bindungsdomäne von p42POP teilweise mit der identifizierten Aktinbindungsstelle überlappen, kann eine Beeinflussung der DNA-Bindung durch die Interaktion von p42POP mit Aktin vermutet werden.

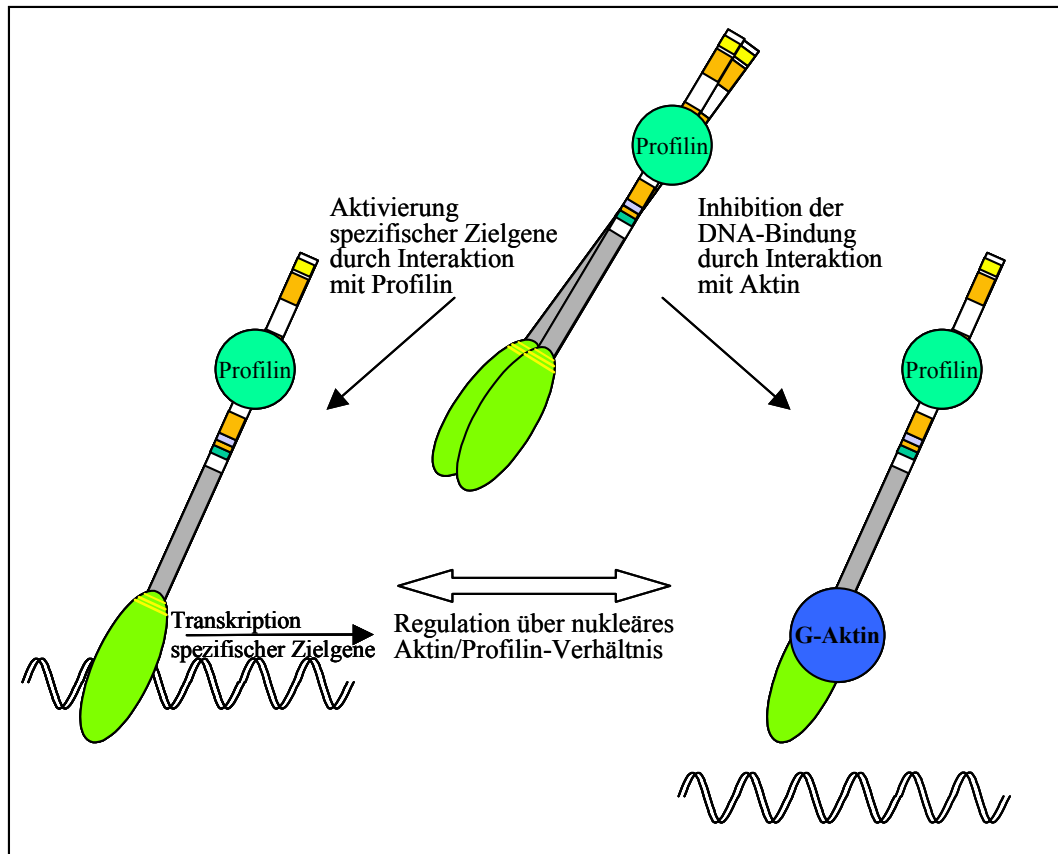


Abb. 36: Hypothese zur Aktivierung von p42POP über das Verhältnis von Aktin zu Profilin. Durch die Interaktion mit Profilin wird die monomere, aktive Form von p42POP stabilisiert und die Bindung von p42POP an DNA ermöglicht. Die Wechselwirkung mit DNA und die damit verbundene Transkription spezifischer Zielgene könnte durch die Interaktion des N-terminalen Bereiches von p42POP mit Aktin reguliert werden. Somit würde das Verhältnis von freiem Aktin zu Profilin Einfluß auf die p42POP-induzierte Transkription nehmen.

Aus den dargestellten Ergebnissen zur Ligandenwechselwirkung von p42POP und seiner Funktion als Transkriptionsfaktor der Myb-Familie läßt sich die folgende Hypothese ableiten (Abb. 36): Das ubiquitär exprimierte p42POP liegt im Zellkern als Dimer - vermittelt durch das Leuzin-Zipper Motiv - in einer transkriptionell inaktiven Form vor. Durch intrazelluläre Stimuli vermittelt, wird p42POP in eine aktive, monomere Form gebracht. Die Inhibierung der Dimerisierung könnte durch posttranslationale Modifikationen (z.B. Phosphorylierung) oder Ligandenbindung vermittelt werden. Weitere potentielle Liganden (SUMO-1, Nebulette, *homeodomain interacting protein kinase* HIPK-1, BAI-1 assoziiertes Protein) konnten für den C-terminalen Bereich von p42POP mittels des *Yeast two-hybrid* System identifiziert werden, bedürfen jedoch einer näheren Charakterisierung. Durch die Interaktion mit Profilin wird p42POP in seiner transkriptionell aktiven Form stabilisiert, deren DNA-Bindung unter anderem via der Interaktion mit Aktin reguliert werden könnte. Eine derartige Regulation der transkriptionellen Aktivität durch intermolekulare Wechselwirkung der DNA-bindenden

Myb-Domäne mit c-Maf und RAR α konnte für c-Myb gezeigt werden (Hedge et al., 1998; Pfitzner et al., 1998). Das Verhältnis von G-Aktin zu Profilin, das in direktem Zusammenhang zur Aktindynamik steht, würde somit Einfluß auf die transkriptionelle Aktivität von p42POP nehmen. Aktin und insbesondere der Aktindynamik konnte bei der Aktivierung von Zielgenen des MADS-Box Transkriptionsfaktors SRF (*serum response factor*), zu denen auch Aktin und Vinculin gehören, eine entscheidende Rolle zugewiesen werden (Sotiropoulos et al., 1999). Zudem scheint die Aktin-Synthese, abhängig von der Konzentration des freien, polymerisierbaren G-Aktins, autoregulatorisch kontrolliert zu sein (Bershadsky et al., 1995), wodurch Aktin in Zusammenhang mit transkriptionellen Ereignissen gebracht wird.

3 Cytoskelettale Proteine und Transkription

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse geben Hinweise auf eine Verbindung zwischen den cytoskelettalen Proteinen Profilin und Aktin und dem Transkriptionsfaktor p42POP. Aktin konnte, wie auch Profilin, nicht nur in Zellkernen verschiedener Zelllinien identifiziert werden, zudem unterscheidet sich seine cytoplasmatische Konformation von der nukleären (Gonsior et al., 1999). Eine temporäre Kernlokalisation von Aktin wird in einigen eukaryotischen Zellen auch durch Stressfaktoren, wie Hitzeschock und DMSO-Behandlung, induziert (Aizawa et al., 1995; Iida and Yahara, 1986; Nishida et al., 1987). Entsprechend könnte eine transkriptionelle Aktivierung von p42POP, das aufgrund seiner funktionellen Kernimport- und Kernexportsignale ein *dual compartment protein* darstellt, durch seine Interaktion mit Aktin und/oder Profilin sowohl im Cytoplasma, als auch im Zellkern erfolgen. Derartige biologisch funktionelle Wechselwirkungen zwischen cytoskelettalen Proteinen und Transkriptionsfaktoren wurden bereits beschrieben. Eine direkte Interaktion konnte zwischen dem Mikrofilament-assoziierten Protein β -Catenin und dem Transkriptionsfaktor LEF-1 (*lymphoid enhancer-binding factor*) im Zellkern gezeigt werden (Behrens et al., 1996; Fagotto et al., 1998). β -Catenin lokalisiert in nicht-stimulierten Zellen in Zell-Zell-Adhäsionsverbindungen und wird im Cytoplasma durch einen Multiproteinkomplex, der u.a. die *glycogen synthase kinase* GSK und das *adenomatous polyposis coli protein* APC umfasst, hydrolysiert. Infolge der Wnt-Signaltransduktionskaskade wird, vermittelt über *frizzled* Rezeptoren, der cytoplasmatische Pool an β -Catenin erhöht und β -Catenin gelangt durch direkte Wechselwirkung mit der Kernporenmaschinerie in den Zellkern. Durch Bindung an

den Transkriptionsfaktor LEF-1 werden spezifische Zielgene, darunter c-Myc und Cyclin D1, β -Catenin-vermittelt aktiviert.

Auch verschiedene Mitglieder der Zyxin-Proteinfamilie könnten eine mögliche Funktion als Mittler zwischen dem Aktincytoskelett und der Genregulation übernehmen. Charakteristisch für diese Proteinfamilie ist die sogenannte LIM-Domäne, die durch eine Cystein- und Histidin-reiche Region definiert ist. Derartige Domänen sind u.a. in verschiedenen Transkriptionsfaktoren und Mitgliedern der *cysteine rich protein* (CRP)-Familie enthalten und vermitteln Protein-Protein-Interaktion. Mit dem LIM-containing *lipoma-preferred partner* LPP konnte ein Aktincytoskelett-assoziiertes Protein identifiziert werden, dass zum einen die Fähigkeit besitzt, zwischen Cytoplasma und Zellkern zu transferieren und zudem transkriptionsaktivierende Eigenschaften aufweist (Petit et al., 2000; Petit et al., 1996). LPP lokalisiert hauptsächlich in Bereichen der Zelladhäsion und Zell-Zell-Kontakten und interagiert mit VASP. Geringe Mengen konnten auch im Zellkern detektiert werden, was auf eine mögliche Funktion von LPP als Mittler zwischen dem Aktincytoskelett und der Genregulation schließen lässt (Petit et al., 2000; Petit et al., 1996). Trip-6 (*thyroid receptor-interacting protein*), einem weiteren Mitglied der Zyxin-Proteinfamilie, konnte neben einem funktionellen Kernexportsignal auch eine transkriptionsaktivierende Eigenschaft zugewiesen werden (Zhao et al., 1999). Eine mögliche Funktion der Zyxin-Proteinfamilie bei der Kommunikation zwischen Bereichen der Zelladhäsion und dem Zellkern wird auch durch die Lokalisation von Zyxin in beiden Kompartimenten untermauert (Nix and Beckerle, 1997; Nix et al., 2001).

Auch für ein anderes cytoskelettales Filamentsystem konnte ein direkter Zusammenhang zur Regulation transkriptioneller Vorgänge gezeigt werden (Rosette and Karin, 1995). Durch die Depolymerisation von Mikrotubuli wird eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B induziert. NF- κ B lokalisiert in inaktiver Form als Komplex mit I κ B im Cytoplasma. Infolge der Depolymerisation der Mikrotubuli erfolgt eine - vermutlich phosphorylierungsabhängige - Degradation von I κ B, durch die der Komplex mit NF- κ B dissoziiert, die Translokation von NF- κ B in den Zellkern induziert wird und entsprechende Zielgene aktiviert werden.

Diese dargestellten Beispiele verdeutlichen, dass Filament-assoziierte Proteine nicht nur das Polymerisationsverhalten und die Stabilität der entsprechenden Filamentsysteme beeinflussen, sondern auch Funktionen im Zellkern übernehmen und die Transkription entsprechender Zielgene modulieren können. Diese duale Funktion ermöglicht es der Zelle, unmittelbar auf verschiedene Stimuli zu reagieren. In diesem Zusammenhang könnte p42POP ein weiteres Bindeglied zwischen cytoskelettalen Proteinen und der Transkription darstellen.

4 Einfluß der Profilin-Phosphorylierung auf die Ligandenwechselwirkung

Profilin spielt eine wichtige Rolle während Differenzierungs- und Proliferationsprozessen und eine Regulation des Expressionslevel von Profilin scheint von essentieller Bedeutung für das Zellschicksal zu sein. Die Depletion von Profilin verursacht sowohl in *Drosophila*, als auch in Mäusen letale Defekte während der Embryogenese (Verheyen and Cooley, 1994; Witke et al., 2001). Zudem konnten Jahnke und Mitarbeiter zeigen, dass zu geringe Mengen an Profilin Tumorigenizität induzieren, sowie Einfluß auf das Zellwachstum, die Organisation des Cytoskeletts und die Zellanheftung nehmen (Janke et al., 2000). Andererseits scheint eine Überexpression von Profilin nur bis zu einem Schwellenwert möglich zu sein (eigene Beobachtung und persönliche Mitteilung Nina Wittenmayer). Diese Beobachtungen implizieren, dass die unterschiedlichen Funktionen von Profilin in Prozessen wie z.B. Zelldifferenzierung, Proliferation, Aktindynamik oder Migration abhängig von der Menge an verfügbarem Profilin sind und diese Funktionen einer strikten Regulation unterliegen müssen. Da diese für Profilin beschriebenen Funktionen durch biologisch funktionelle Interaktionen mit verschiedenen Liganden vermittelt werden, ist zu vermuten, dass entsprechende regulatorische Mechanismen in die Ligandenwechselwirkung involviert sind. In diesem Zusammenhang könnte der PKC-vermittelten Phosphorylierung von Profilin I an Serin 138 (Hansson et al., 1988; Singh et al., 1996; Vemuri and Singh, 2001) eine wichtige Rolle zukommen. Diese Modifikation könnte im Rahmen der PIP₂-vermittelten Signaltransduktion erfolgen (Abb. 37): Profilin lokalisiert in Bereichen einer hohen Dynamik der Plasmamembran bedingt durch ein dynamisches Aktinnetzwerk. Durch die Aktivierung der Phospholipase C γ 1 infolge einer durch die Rezeptor-Tyrosin-Kinase vermittelten Phosphorylierung wird die Hydrolyse des Profilin gebundenen PIP₂ zu DAG und IP₃ induziert und Profilin könnte folglich in Prozesse der Aktindynamik involviert werden (Goldschmidt-Clermont et al., 1991a). Zudem erfolgt durch DAG eine Rekrutierung der Protein Kinase C (PKC) an die Plasmamembran und deren Aktivierung. Dadurch könnte die PKC im Rahmen dieser Signaltransduktionskaskade regulatorisch auf das Bindungsverhalten von Profilin und damit dessen Funktion wirken (Abb. 37, rote Pfeile).

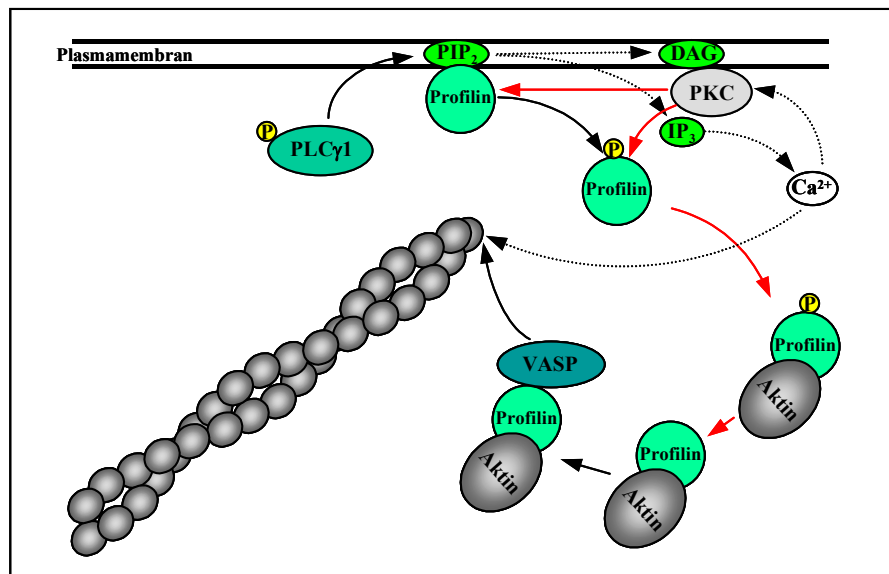


Abb. 37: Profilin als Mittler zwischen Signaltransduktion und Aktindynamik (modifiziert nach Schlüter et al., 1997)

Aktindynamik und Umorganisation des Aktincytoskeletts sind Basis von Prozessen wie z.B. Zellausbreitung, Migration oder Ausbildung neuer Zell-Matrix-Kontakte. Die Modulation von Proteinen infolge einer PKC-abhängigen Phosphorylierung und durch Phosphoinositid-Bindung ist in der Regulation dieser Prozesse involviert (Defilippi et al., 1997; Laux et al., 2000; Myat et al., 1997; Vuori and Ruoslahti, 1993). Talin, Vinculin und Filamin stellen potentielle *in vivo* PKC-Substrate dar (Schwienbacher et al., 1996; Stossel et al., 2001; Turner et al., 1989; Weekes et al., 1996; Ziegler et al., 2002), jedoch ist der Einfluß ihrer Phosphorylierung auf die Organisation des Aktincytoskeletts unklar. Profilin I konnte als weiteres Aktin-assoziiertes Protein als PKC Substrat identifiziert (Hansson et al., 1988; Singh et al., 1996; Vemuri and Singh, 2001) und somit eine mögliche Verbindung zwischen PIP₂-vermittelter Phosphorylierung und der Aktindynamik hergestellt werden. Die *in vitro* charakterisierte PKC-Phosphorylierungsstelle Serin 138 (Singh et al., 1996) ist in der hydrophoben Region lokalisiert, die als Bindungsdomäne für prolinreiche Liganden dient (Abb. 39). Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch entsprechende Mutanten der Einfluß dieser Phosphorylierungsstelle auf die Wechselwirkung mit poly-L-Prolin Liganden gezeigt werden. Durch die Simulation einer Phosphorylierung infolge der Einführung einer negativen Ladung und der dadurch bedingten Änderung des hydrophoben Charakters der poly-L-Prolin-Bindungsdomäne wurde die Interaktion von Profilin I und IIa mit unterschiedlichen prolinreichen Liganden (SMN und p42POP) und poly-L-Prolin-Sepharose nahezu inhibiert. Mittels *in vitro* phosphoryliertem Protein konnte zumindest für Profilin I dieser Einfluß bestätigt werden, wogegen die Interaktion von Profilin IIa mit poly-L-Prolin durch PKC-

Phosphorylierung nicht beeinflusst wurde. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass es sich beim entsprechenden Serin 138 in Profilin IIa nicht um eine PKC-Phosphorylierungsstelle handelt und die Bindung an prolinreiche Liganden bei den beiden Profilin-Isoformen unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegt. Die Notwendigkeit einer Regulation der Interaktion von Profilin und prolinreichen Liganden wird durch die steigende Anzahl entsprechender Proteine (siehe Einleitung) offensichtlich. In diesem Zusammenhang erfordert die diskutierte Funktion von Profilin als „Puffer“ für prolinreiche Proteine eine transiente und lokale Regulation der Bindung, zumal Profilin und seine prolinreichen Liganden sowohl im Cytoplasma, als auch im Zellkern lokalisiert sind.

Eine temporäre und lokale Modulation von Profilin durch Phosphorylierung könnte dabei einen möglichen Mechanismus darstellen, zumal die verschiedenen PKC-Isoformen zum einen an der Plasmamembran in aktiver Form vorliegen und bedingt durch Kernimportsignale im Zellkern lokalisieren können. Für verschiedene PKC-Isoformen konnte zudem eine unterschiedliche subnukleäre Lokalisation und Einfluß auf Prozesse der Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose nachgewiesen werden.

Im Bezug auf die Interaktion zwischen Profilin und p42POP könnte durch die Phosphorylierung von Profilin die Stabilisierung der monomeren Form von p42POP reguliert werden. Analog zur potentiellen Phosphorylierungsstelle Threonin 273 in p42POP würde eine Phosphorylierung von Profilin am Serin 138 zur Dissoziation des Komplexes und folglich zu einer Ausbildung von p42POP-Homodimeren führen.

Die PKC-vermittelte Phosphorylierung von Profilin I könnte auch bei der Verbindung zwischen Aktindynamik und dem Phosphatidylinositol-Zyklus von Bedeutung sein (siehe Abb. 37, rote Pfeile). Infolge der Hydrolyse von PIP_2 durch die Phospholipase $\text{C}\gamma 1$ wird die Freisetzung von Profilin sowie die Aktivierung der PKC induziert. Durch die Phosphorylierung von Profilin an Serin 138 kann Profilin nicht mit poly-L-Prolin Liganden interagieren und steht ausschließlich zur Komplexbildung mit Aktin zur Verfügung. Eine Dephosphorylierung der Profilin-Aktin-Komplexe, die von entsprechenden Phosphatasen vermittelt wird, ermöglicht im Folgenden eine spezifische Wechselwirkung mit z.B. VASP und kann somit spezifisch die Aktindynamik induzieren (Abb. 37 und 38). Ein derartiger Einfluß einer Phosphorylierung auf die Aktindynamik konnte bereits für VASP gezeigt werden (Harbeck et al., 2000).

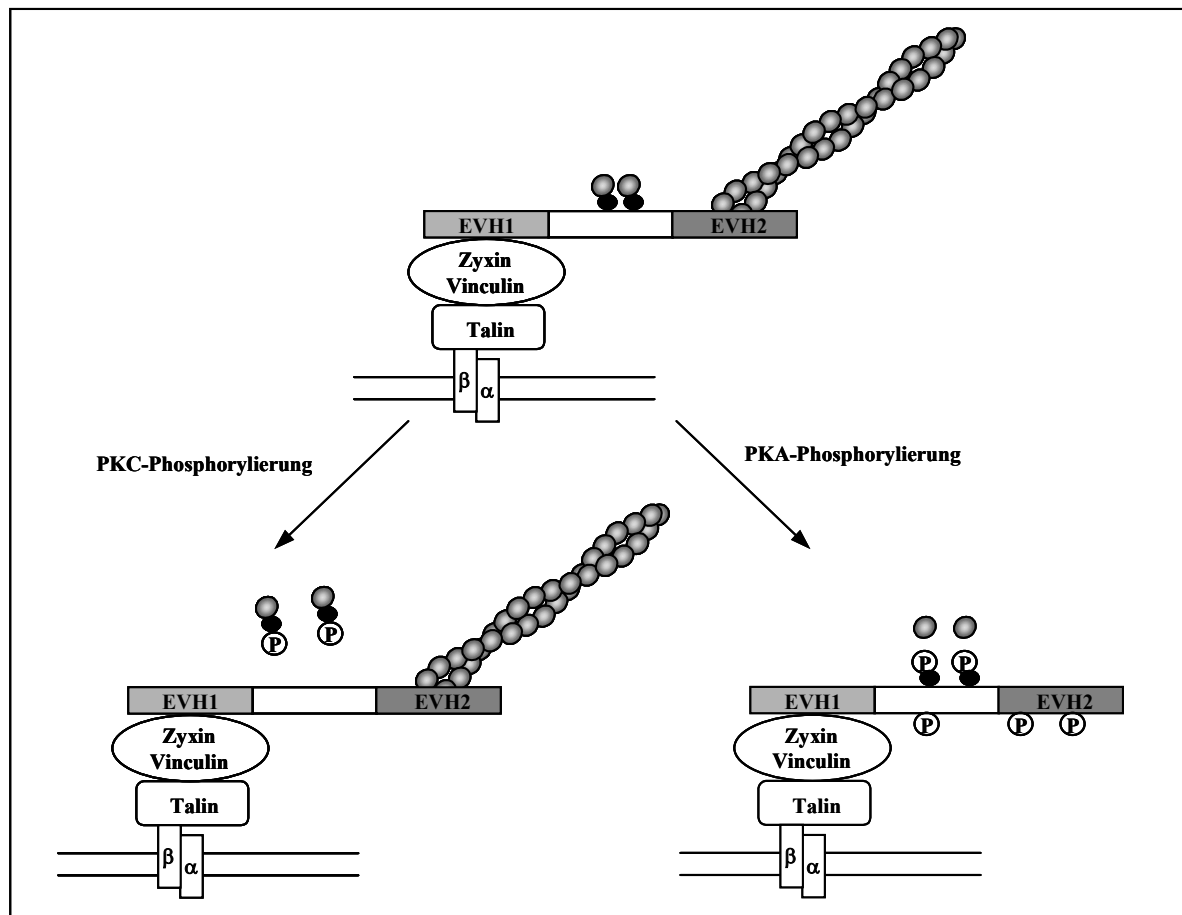


Abb. 38: Potentieller Einfluß der Profilin-Phosphorylierung durch PKC oder PKA auf die Aktinpolymerisation an Zell-Matrix-Kontakten. Infolge der PKC-vermittelten Phosphorylierung von Profilin wird die Interaktion mit prolinreichen Liganden (z.B. VASP) inhibiert und eine (weitere) VASP-induzierte Aktinpolymerisation verhindert. Die PKA-vermittelte Phosphorylierung inhibiert einerseits durch die Modifikation von VASP die Aktinpolymerisation und induziert zudem durch Phosphorylierung von Profilin die Dissoziation der Profilin-Aktin-Komplexe, so dass es zu einem synergistischen Effekt der PKA-Phosphorylierung im Hinblick auf die Aktindynamik kommt. (Abbildung modifiziert nach Harbeck et al., 2000)

Da im Rahmen dieser Arbeit die *in vitro* Phosphorylierungsstellen der PKA innerhalb der Profilin-Isoformen I und IIa nicht identifiziert wurden, sondern ausschließlich deren Effekt auf die Interaktion mit poly-L-Prolin und G-Aktin untersucht wurde, stellt sich die Frage, inwieweit kalkulierte PKA-Phosphorylierungsstellen (siehe Tab. 7) mit den erhaltenen Ergebnissen in Verbindung zu setzen sind.

Tab. 7: Potentielle PKA-Phosphorylierungsstellen in MPI bzw. MPIIa (nach NetPhos 2.0)

	Phosphorylierungsstelle		Phosphorylierungsstelle
MPI	S58	MPIIa	S72
	S77		S77
	S92		S92

Die Positionen dieser möglichen Phosphorylierungsstellen im Strukturmodell verdeutlichen, dass die identifizierten Aminosäuren innerhalb der Bindungsregion für Aktin liegen und somit in Einklang mit den erhaltenen Ergebnissen stehen (Abb. 39). Die Phosphorylierungsstelle Serin 92, die in beiden Profilin-Isoformen enthalten ist, ist zudem in der Bindungsdomäne für Phosphoinositide lokalisiert und könnte entsprechend regulatorisch auf die Wechselwirkung mit PIP₂ wirken.

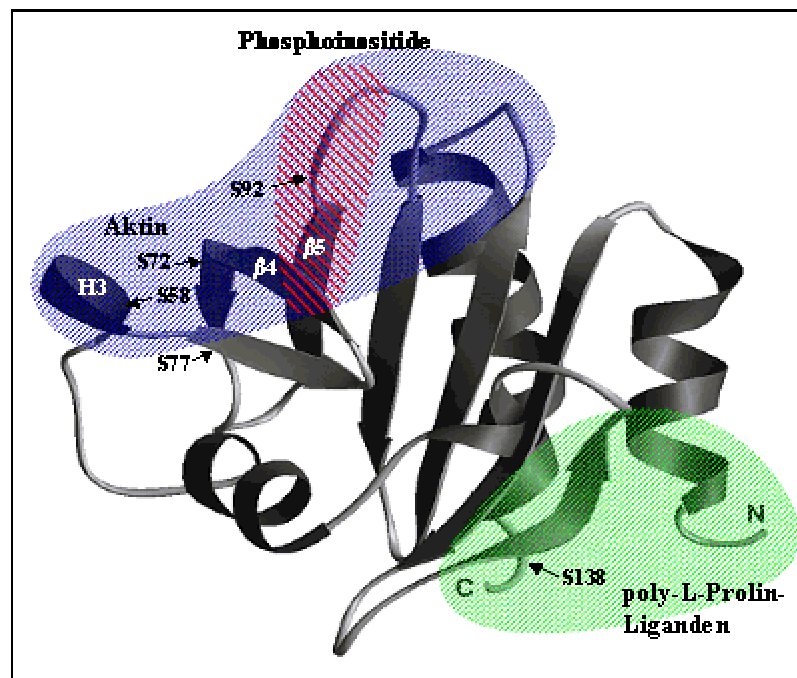


Abb. 39: Lokalisation der potentiellen Profilin I bzw. IIa Phosphorylierungsstellen (siehe Tab. 7). Die bereits beschriebene PKC-Phosphorylierungsstelle Serin 138 (Singh et al., 1996) im hydrophoben Bindungsbereich für poly-L-Prolin-Liganden wurde ebenfalls markiert (Modell modifiziert nach Schlüter et al., 1997).

Der Einfluß verschiedener Profilin-Mutanten in unmittelbarer Umgebung zu den potentiellen Phosphorylierungsstellen wurden im Bezug auf ihre Bindungseigenschaften an Aktin, PIP₂ und prolinreichen Liganden bereits beschrieben. In Kokristallen des Profilin-Aktin-Komplexes tritt Rinderprofilin an zwei Stellen in engen Kontakt mit zwei verschiedenen Aktin-Molekülen (Schutt et al., 1993). Die vermutlich ausschlaggebende Region bei der Wechselwirkung mit Aktin umfasst den N-terminalen Bereich der Helix 4, Helix 3, sowie die β -Faltblattstränge 4, 5 und 6 des Profilin-Moleküls. Biochemisch konnte u.a. durch die

Mutationen F59A und V60E in Rinderprofilin I die Bedeutung dieser Region durch die Reduktion der Affinität zu Aktin belegt werden (Schluter et al., 1998). Da die potentielle Phosphorylierungsstelle S58 in unmittelbarer Nähe zu diesen Mutationen liegt, wäre ein Einfluß dieser Phosphorylierung von Profilin durch PKA auf die Interaktion mit Aktin denkbar. Bei der Wechselwirkung mit PIP₂ scheint ebenfalls der β -Faltblattstrang 5 involviert zu sein, insbesondere ein Bereich von 10 Aminosäuren um Arginin 88. Die in beiden Profilin-Isoformen enthaltene potentielle Phosphorylierungsstelle Serin 92 könnte in diesem Zusammenhang nicht nur die Wechselwirkung mit Aktin, sondern auch die Bindung von Profilin an PIP₂ beeinflussen.

Der spezifische Einfluß der Phosphorylierung der Serin/Threonin Kinasen PKC und PKA auf die Ligandeninteraktion der Profileine I und IIa könnte somit einen Mechanismus zur Regulation ihrer Funktion bei Prozessen der Aktindynamik darstellen und unterstützt die hypothetische Funktion von Profilin als „Puffer“ für prolinreiche Liganden, die über transiente Phosphorylierungsvorgänge aktiviert werden könnten.

5 Ausblick

Die Identifizierung des bisher unbekannten Transkriptionsfaktor p42POP als Profilin-Ligand und Mitglied der Myb-Proteinfamilie lässt eine Beteiligung von Profilin bei der Transkription vermuten. Durch die Charakterisierung der Bindungsregion sowie der Identifizierung des potentiellen Regulationsmechanismus der Interaktion zwischen p42POP und Profilin über die PKC-vermittelte Phosphorylierung von Threonin 273 konnte die Grundlage geschaffen werden, um einen möglichen Einfluß von Profilin auf die p42POP-induzierte Transkription zu analysieren. Da der zelluläre Expressionslevel von Profilin offenbar einer strengen Kontrolle unterliegt, läßt sich der Einfluß von Profilin auf die p42POP-vermittelte Aktivierung der Transkription nicht durch einfache Überexpressionsexperimente untersuchen. Durch einen von Dignam und Röder (Dignam et al., 1983) etablierten Transkriptionsassay, in dem die Transaktivierung in Kernextrakten in Abhängigkeit von einer G-freien DNA-Kassette analysiert wird, könnte diese Problematik umgangen werden. Entsprechend könnte der Einfluß von Profilin auf die Transkription durch Depletion mit poly-L-Prolin-Peptiden oder Inaktivierung durch spezifische Antikörper untersucht werden. Zudem bietet das von der Firma Atugen entwickelte *genebloc*-System oder RNAi-Technologie, die eine transiente

Reduktion des endogenen Profilinlevels induzieren, Möglichkeiten die Funktion von Profilin bei Prozessen der Transkription zu analysieren.

Obwohl verschiedene Hinweise für eine mögliche Rolle von Aktin bei der Transkription vorliegen, ist die biologische Funktion von Aktin im Zellkern unklar. Daher sollte die Interaktion zwischen p42POP und Aktin im Bezug auf diese zellulären Prozesse näher untersucht werden. Insbesondere der Einfluß dieser Wechselwirkung auf die Bindungseigenschaften von p42POP an DNA wäre dabei von besonderem Interesse, zumal die identifizierte Aktin-Bindungsstelle mit dem C-terminalen Bereich der DNA-bindenden Domäne von p42POP überlappt.

Um Aufschluß über die zelluläre Funktion von p42POP zu erhalten, ist die Identifizierung spezifischer Zielgene durch z.B. subtraktive PCR oder *differential Display* unabdingbar. Solche Daten würden auch Studien zur Aufklärung der biologische Signifikanz der Interaktion zwischen p42POP und verschiedenen Liganden ermöglichen und gleichzeitig zum Verständnis der Funktion cytoskelettaler Proteine im Zellkern und bei Prozessen der Genregulation beitragen.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Identifizierung verschiedener Phosphorylierungsstellen in Profilin I bzw. IIa und der Einfluß der PKC- oder PKA-vermittelten Phosphorylierung auf das Bindungsverhalten von Profilin an prolinreiche Liganden und Aktin. Phosphopeptidanalysen und MALDI (*matrix-assisted laser desorption ionization*) Studien zur Charakterisierung der Profilin-Phosphorylierungsstellen könnten zusammen mit der Röntgenstruktur Aufschluß über mögliche Funktionen der Phosphorylierung liefern. Durch die Generierung entsprechender Mutanten könnte der Einfluß der einzelnen Phosphorylierungsstellen auf spezifische Ligandenwechselwirkung (prolinreiche Liganden, Aktin, PIP₂), sowie auf komplexere Vorgänge der Aktinpolymerisation u.a. im Zusammenspiel mit VASP und bei der Fortbewegung von Listerien in infizierten Zellen untersucht werden.

V LITERATURVERZEICHNIS

- Aizawa, H., Sutoh, K., Tsubuki, S., Kawashima, S., Ishii, A. and Yahara, I. (1995) Identification, characterization, and intracellular distribution of cofilin in *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem*, **270**, 10923-32.
- Arany, Z., Sellers, W.R., Livingston, D.M. and Eckner, R. (1994) E1A-associated p300 and CREB-associated CBP belong to a conserved family of coactivators. *Cell*, **77**, 799-800.
- Archer, S.J., Vinson, V.K., Pollard, T.D. and Torchia, D.A. (1994) Elucidation of the poly-L-proline binding site in *Acanthamoeba* profilin I by NMR spectroscopy. *FEBS Lett*, **337**, 145-51.
- Aziz, N., Miglarese, M.R., Hendrickson, R.C., Shabanowitz, J., Sturgill, T.W., Hunt, D.F. and Bender, T.P. (1995) Modulation of c-Myb-induced transcription activation by a phosphorylation site near the negative regulatory domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 6429-33.
- Balasubramanian, M.K., Hirani, B.R., Burke, J.D. and Gould, K.L. (1994) The *Schizosaccharomyces pombe cdc3+* gene encodes a profilin essential for cytokinesis. *J Cell Biol*, **125**, 1289-301.
- Baranowskij, N., Froberg, C., Prat, S. and Willmitzer, L. (1994) A novel DNA binding protein with homology to Myb oncoproteins containing only one repeat can function as a transcriptional activator. *Embo J*, **13**, 5383-92.
- Barry, S.T. and Critchley, D.R. (1994) The RhoA-dependent assembly of focal adhesions in Swiss 3T3 cells is associated with increased tyrosine phosphorylation and the recruitment of both pp125FAK and protein kinase C-delta to focal adhesions. *J Cell Sci*, **107**, 2033-45.
- Behrens, J., von Kries, J.P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R. and Birchmeier, W. (1996) Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, **382**, 638-42.
- Bershadsky, A.D., Gluck, U., Denisenko, O.N., Sklyarova, T.V., Spector, I. and Ben-Ze'ev, A. (1995) The state of actin assembly regulates actin and vinculin expression by a feedback loop. *J Cell Sci*, **108**, 1183-93.

- Beug, H., Blundell, P.A. and Graf, T. (1987) Reversibility of differentiation and proliferative capacity in avian myelomonocytic cells transformed by tsE26 leukemia virus. *Genes Dev*, **1**, 277-86.
- Biedenkapp, H., Borgmeyer, U., Sippel, A.E. and Klempnauer, K.H. (1988) Viral myb oncogene encodes a sequence-specific DNA-binding activity. *Nature*, **335**, 835-7.
- Bjorkegren, C., Rozycki, M., Schutt, C.E., Lindberg, U. and Karlsson, R. (1993) Mutagenesis of human profilin locates its poly(L-proline)-binding site to a hydrophobic patch of aromatic amino acids. *FEBS Lett*, **333**, 123-6.
- Bjorkegren-Sjogren, C., Korenbaum, E., Nordberg, P., Lindberg, U. and Karlsson, R. (1997) Isolation and characterization of two mutants of human profilin I that do not bind poly(L-proline). *FEBS Lett*, **418**, 258-64.
- Blasco, R., Cole, N.B. and Moss, B. (1991) Sequence analysis, expression, and deletion of a vaccinia virus gene encoding a homolog of profilin, a eukaryotic actin-binding protein. *J Virol*, **65**, 4598-608.
- Blau, H.M., Pavlath, G.K., Hardeman, E.C., Chiu, C.P., Silberstein, L., Webster, S.G., Miller, S.C. and Webster, C. (1985) Plasticity of the differentiated state. *Science*, **230**, 758-66.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-54.
- Braun, A., Aszodi, A., Hellebrand, H., Berna, A., Fassler, R. and Brandau, O. (2002) Genomic organization of profilin-III and evidence for a transcript expressed exclusively in testis. *Gene*, **283**, 219-25.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. and Short, J.M. (1987) From genes to clones: An introduction to gene technology. Weinheim: VCH.
- Burk, O., Mink, S., Ringwald, M. and Klempnauer, K.H. (1993) Synergistic activation of the chicken mim-1 gene by v-myb and C/EBP transcription factors. *Embo J*, **12**, 2027-38.
- Burke, E., Dupuy, L., Wall, C. and Barik, S. (1998) Role of cellular actin in the gene expression and morphogenesis of human respiratory syncytial virus. *Virology*, **252**, 137-48.
- Burke, E., Mahoney, N.M., Almo, S.C. and Barik, S. (2000) Profilin is required for optimal actin-dependent transcription of respiratory syncytial virus genome RNA. *J Virol*, **74**, 669-75.

- Buss, F., Temm-Grove, C., Henning, S. and Jockusch, B.M. (1992) Distribution of profilin in fibroblasts correlates with the presence of highly dynamic actin filaments. *Cell Motil Cytoskeleton*, **22**, 51-61.
- Cao, L.G., Babcock, G.G., Rubenstein, P.A. and Wang, Y.L. (1992) Effects of profilin and profilactin on actin structure and function in living cells. *J Cell Biol*, **117**, 1023-9.
- Carlier, M.F., Jean, C., Rieger, K.J., Lenfant, M. and Pantaloni, D. (1993) Modulation of the interaction between G-actin and thymosin beta 4 by the ATP/ADP ratio: possible implication in the regulation of actin dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 5034-5038.
- Carlsson, L., Nystrom, L., Sundkvist, I.I., Markey, F. and Lindberg, U. (1976) Profilin, a low-molecular weight protein controlling actin polymerisability. pp. 39-49. In: Perry SV, et al., ed. *Contractile systems in non muscle tissues*. Amsterdam, North Holland Publ, **647**, 29.
- Cassimeris, L., Safer, D., Nachmias, V.T. and Zigmond, S.H. (1992) Thymosin beta 4 sequesters the majority of G-actin in resting human polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol*, **119**, 1261-1270.
- Cedergren-Zeppezauer, E.S., Goonesekere, N.C., Rozycki, M.D., Myslik, J.C., Dauter, Z., Lindberg, U. and Schutt, C.E. (1994) Crystallization and structure determination of bovine profilin at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol*, **240**, 459-75.
- Chang, F., Drubin, D. and Nurse, P. (1997) cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin. *J Cell Biol*, **137**, 169-82.
- Clark, T.G. and Rosenbaum, J.L. (1979) An actin filament matrix in hand-isolated nuclei of *X. laevis* oocytes. *Cell*, **18**, 1101-8.
- Cogswell, J.P., Cogswell, P.C., Kuehl, W.M., Cuddihy, A.M., Bender, T.M., Engelke, U., Marcu, K.B. and Ting, J.P. (1993) Mechanism of c-myc regulation by c-Myb in different cell lineages. *Mol Cell Biol*, **13**, 2858-69.
- Cooley, L., Verheyen, E. and Ayers, K. (1992) chickadee encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Cell*, **69**, 173-84.
- Craig, R.W. and Bloch, A. (1984) Early decline in c-myb oncogene expression in the differentiation of human myeloblastic leukemia (ML-1) cells induced with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res*, **44**, 442-6.

- Dai, P., Akimaru, H., Tanaka, Y., Hou, D.X., Yasukawa, T., Kanei-Ishii, C., Takahashi, T. and Ishii, S. (1996) CBP as a transcriptional coactivator of c-Myb. *Genes Dev*, **10**, 528-40.
- Dasgupta, P. and Reddy, E.P. (1989) Identification of alternatively spliced transcripts for human c-myb: molecular cloning and sequence analysis of human c-myb exon 9A sequences. *Oncogene*, **4**, 1419-23.
- Dash, A.B., Orrico, F.C. and Ness, S.A. (1996) The EVES motif mediates both intermolecular and intramolecular regulation of c-Myb. *Genes Dev*, **10**, 1858-69.
- Defilippi, P., Venturino, M., Gulino, D., Duperray, A., Boquet, P., Fiorentini, C., Volpe, G., Palmieri, M., Silengo, L. and Tarone, G. (1997) Dissection of pathways implicated in integrin-mediated actin cytoskeleton assembly. Involvement of protein kinase C, Rho GTPase, and tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, **272**, 21726-34.
- Di Nardo, A., Gareus, R., Kwiatkowski, D. and Witke, W. (2000) Alternative splicing of the mouse profilin II gene generates functionally different profilin isoforms. *J Cell Sci*, **113**, 3795-803.
- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M. and Roeder, R.G. (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*, **11**, 1475-89.
- Domke, T., Federau, T., Schluter, K., Giehl, K., Valenta, R., Schomburg, D. and Jockusch, B.M. (1997) Birch pollen profilin: structural organization and interaction with poly-(L-proline) peptides as revealed by NMR. *FEBS Lett*, **411**, 291-5.
- Dudek, H. and Reddy, E.P. (1989a) Identification of two translational products for c-myb. *Oncogene*, **4**, 1061-6.
- Dudek, H. and Reddy, E.P. (1989b) Murine myeloid leukemias with aberrant myb loci show heterogeneous expression of novel myb proteins. *Oncogene*, **4**, 1489-95.
- Dudek, H., Tantravahi, R.V., Rao, V.N., Reddy, E.S. and Reddy, E.P. (1992) Myb and Ets proteins cooperate in transcriptional activation of the mim- 1 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 1291-5.
- Duprey, S.P. and Boettiger, D. (1985) Developmental regulation of c-myb in normal myeloid progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 6937-41.
- England, B.P., Admon, A. and Tjian, R. (1992) Cloning of Drosophila transcription factor Adf-1 reveals homology to Myb oncoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 683-7.

- Evangelista, M., Blundell, K., Longtine, M.S., Chow, C.J., Adames, N., Pringle, J.R., Peter, M. and Boone, C. (1997) Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science*, **276**, 118-22.
- Evans, J.L., Moore, T.L., Kuehl, W.M., Bender, T. and Ting, J.P. (1990) Functional analysis of c-Myb protein in T-lymphocytic cell lines shows that it trans-activates the c-myc promoter. *Mol Cell Biol*, **10**, 5747-52.
- Fagotto, F., Gluck, U. and Gumbiner, B.M. (1998) Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin- independent nuclear import of beta-catenin. *Curr Biol*, **8**, 181-90.
- Fan, X.C. and Steitz, J.A. (1998a) HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 15293-8.
- Fan, X.C. and Steitz, J.A. (1998b) Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *Embo J*, **17**, 3448-60.
- Favier, D. and Gonda, T.J. (1994) Detection of proteins that bind to the leucine zipper motif of c-Myb. *Oncogene*, **9**, 305-11.
- Fedorov, A.A., Magnus, K.A., Graupe, M.H., Lattman, E.E., Pollard, T.D. and Almo, S.C. (1994) X-ray structures of isoforms of the actin-binding protein profilin that differ in their affinity for phosphatidylinositol phosphates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8636-40.
- Feilotter, H.E., Hannon, G.J., Ruddell, C.J. and Beach, D. (1994) Construction of an improved host strain for two hybrid screening. *Nucleic Acids Res*, **22**, 1502-3.
- Feldbrugge, M., Sprenger, M., Hahlbrock, K. and Weisshaar, B. (1997) PcMYB1, a novel plant protein containing a DNA-binding domain with one MYB repeat, interacts in vivo with a light-regulatory promoter unit. *Plant J*, **11**, 1079-93.
- Finkel, T., Theriot, J.A., Dise, K.R., Tomaselli, G.F. and Goldschmidt-Clermont, P.J. (1994) Dynamic actin structures stabilized by profilin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 1510-4.
- Foos, G., Grimm, S. and Klempnauer, K.H. (1994) The chicken A-myb protein is a transcriptional activator. *Oncogene*, **9**, 2481-8.
- Frampton, J., Gibson, T.J., Ness, S.A., Doderlein, G. and Graf, T. (1991) Proposed structure for the DNA-binding domain of the Myb oncoprotein based on model building and mutational analysis. *Protein Eng*, **4**, 891-901.

- Gabrielsen, O.S., Sentenac, A. and Fromageot, P. (1991) Specific DNA binding by c-Myb: evidence for a double helix-turn-helix- related motif. *Science*, **253**, 1140-3.
- Geese, M., Loureiro, J.J., Bear, J.E., Wehland, J., Gertler, F.B. and Sechi, A.S. (2002) Contribution of Ena/VASP proteins to intracellular motility of *Listeria* requires phosphorylation and proline-rich core but not F-actin binding or multimerization. *Mol Biol Cell*, **13**, 2383-96.
- Geese, M., Schluter, K., Rothkegel, M., Jockusch, B.M., Wehland, J. and Sechi, A.S. (2000) Accumulation of profilin II at the surface of *Listeria* is concomitant with the onset of motility and correlates with bacterial speed. *J Cell Sci*, **113**, 1415-26.
- Gertler, F.B., Niebuhr, K., Reinhard, M., Wehland, J. and Soriano, P. (1996) Mena, a relative of VASP and *Drosophila Enabled*, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell*, **87**, 227-39.
- Giesemann, T., Rathke-Hartlieb, S., Rothkegel, M., Bartsch, J.W., Buchmeier, S., Jockusch, B.M. and Jockusch, H. (1999) A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems. *J Biol Chem*, **274**, 37908-14.
- Giuliano, K.A. and Taylor, D.L. (1994) Fluorescent actin analogs with a high affinity for profilin in vitro exhibit an enhanced gradient of assembly in living cells. *J Cell Biol*, **124**, 971-83.
- Gluzman, Y. (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, **23**, 175-82.
- Goldschmidt-Clermont, P.J., Kim, J.W., Machesky, L.M., Rhee, S.G. and Pollard, T.D. (1991a) Regulation of phospholipase C-gamma 1 by profilin and tyrosine phosphorylation. *Science*, **251**, 1231-3.
- Goldschmidt-Clermont, P.J., Machesky, L.M., Baldassare, J.J. and Pollard, T.D. (1990) The actin-binding protein profilin binds to PIP2 and inhibits its hydrolysis by phospholipase C. *Science*, **247**, 1575-8.
- Goldschmidt-Clermont, P.J., Machesky, L.M., Doberstein, S.K. and Pollard, T.D. (1991b) Mechanism of the interaction of human platelet profilin with actin. *J Cell Biol*, **113**, 1081-9.
- Gonda, T.J. and Metcalf, D. (1984) Expression of myb, myc and fos proto-oncogenes during the differentiation of a murine myeloid leukaemia. *Nature*, **310**, 249-51.

- Gonsior, S.M., Platz, S., Buchmeier, S., Scheer, U., Jockusch, B.M. and Hinssen, H. (1999) Conformational difference between nuclear and cytoplasmic actin as detected by a monoclonal antibody. *J Cell Sci*, **112**, 797-809.
- Gossen, M. and Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5547-51.
- Guerra, J., Withers, D.A. and Boxer, L.M. (1995) Myb binding sites mediate negative regulation of c-myb expression in T- cell lines. *Blood*, **86**, 1873-80.
- Gunning, P.W., Ferguson, V., Brennan, K.J. and Hardeman, E.C. (2001) α -Skeletal actin induces a subset of muscle genes independently of muscle differentiation and withdrawal from the cell cycle. *J Cell Sci*, **114**, 513-524.
- Haarer, B.K., Lillie, S.H., Adams, A.E., Magdolen, V., Bandlow, W. and Brown, S.S. (1990) Purification of profilin from *Saccharomyces cerevisiae* and analysis of profilin-deficient cells. *J Cell Biol*, **110**, 105-14.
- Haarer, B.K., Petzold, A.S. and Brown, S.S. (1993) Mutational analysis of yeast profilin. *Mol Cell Biol*, **13**, 7864-73.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-80.
- Hansson, A., Skoglund, G., Lassing, I., Lindberg, U. and Ingelman-Sundberg, M. (1988) Protein kinase C-dependent phosphorylation of profilin is specifically stimulated by phosphatidylinositol bisphosphate (PIP₂). *Biochem Biophys Res Commun*, **150**, 526-31.
- Harbeck, B., Huttelmaier, S., Schluter, K., Jockusch, B.M. and Illenberger, S. (2000) Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin. *J Biol Chem*, **275**, 30817-25.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S.J. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**: 805-16.
- Haugwitz, M., Noegel, A.A., Karakesisoglou, J. and Schleicher, M. (1994) Dictyostelium amoebae that lack G-actin-sequestering profilins show defects in F-actin content, cytokinesis, and development. *Cell*, **79**, 303-14.
- He, X.Y., Antao, V.P., Basila, D., Marx, J.C. and Davis, B.R. (1992) Isolation and molecular characterization of the human CD34 gene. *Blood*, **79**, 2296-302.

- Hedge, S.P., Kumar, A., Kurschner, C. and Shapiro, L.H. (1998) c-Maf interacts with c-Myb to regulate transcription of an early myeloid gene during differentiation. *Mol Cell Biol*, **18**, 2729-37.
- Herman, I.M. (1993) Actin isoforms. *Curr Opin Cell Biol*, **5**, 48-55.
- Hill, M.A., Schedlich, L. and Gunning, P. (1994) Serum-induced signal transduction determines the peripheral location of beta-actin mRNA within the cell. *J Cell Biol*, **126**, 1221-9.
- Honore, B., Madsen, P., Andersen, A.H. and Leffers, H. (1993) Cloning and expression of a novel human profilin variant, profilin II. *FEBS Lett*, **330**, 151-5.
- Howe, K.M., Reakes, C.F. and Watson, R.J. (1990) Characterization of the sequence-specific interaction of mouse c-myb protein with DNA. *Embo J*, **9**, 161-9.
- Hu, E., Chen, Z., Fredrickson, T. and Zhu, Y. (2001) Molecular cloning and characterization of profilin-3: a novel cytoskeleton-associated gene expressed in rat kidney and testes. *Exp Nephrol*, **9**, 265-74.
- Huang, Y.T., Romito, R.R., De, B.P. and Banerjee, A.K. (1993) Characterization of the in vitro system for the synthesis of mRNA from human respiratory syncytial virus. *Virology*, **193**, 862-7.
- Iida, K. and Yahara, I. (1986) Reversible induction of actin rods in mouse C3H-2K cells by incubation in salt buffers and by treatment with non-ionic detergents. *Exp Cell Res*, **164**, 492-506.
- Imamura, H., Tanaka, K., Hihara, T., Umikawa, M., Kamei, T., Takahashi, K., Sasaki, T. and Takai, Y. (1997) Bni1p and Bnr1p: downstream targets of the Rho family small G-proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, **16**, 2745-55.
- Introna, M., Golay, J., Frampton, J., Nakano, T., Ness, S.A. and Graf, T. (1990) Mutations in v-myb alter the differentiation of myelomonocytic cells transformed by the oncogene. *Cell*, **63**, 1289-97.
- Jaken, S. (1996) Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 168-73.
- Jaken, S., Leach, K. and Klauck, T. (1989) Association of type 3 protein kinase C with focal contacts in rat embryo fibroblasts. *J Cell Biol*, **109**, 697-704.

- Janke, J., Schluter, K., Jandrig, B., Theile, M., Kolble, K., Arnold, W., Grinstein, E., Schwartz, A., Estevez-Schwarz, L., Schlag, P.M., Jockusch, B.M. and Scherneck, S. (2000) Suppression of tumorigenicity in breast cancer cells by the microfilament protein profilin 1. *J Exp Med*, **191**, 1675-86.
- Jockusch, B.M., Becker, M., Hindennach, I. and Jockusch, E. (1974) Slime mould actin: homology to vertebrate actin and presence in the nucleus. *Exp Cell Res*, **89**, 241-6.
- Jonckheere, V., Lambrechts, A., Vandekerckhove, J. and Ampe, C. (1999) Dimerization of profilin II upon binding the (GP5)3 peptide from VASP overcomes the inhibition of actin nucleation by profilin II and thymosin beta4. *FEBS Lett*, **447**, 257-63.
- Kalkbrenner, F., Guehmann, S. and Moelling, K. (1990) Transcriptional activation by human c-myb and v-myb genes. *Oncogene*, **5**, 657-61.
- Kanei-Ishii, C., MacMillan, E.M., Nomura, T., Sarai, A., Ramsay, R.G., Aimoto, S., Ishii, S. and Gonda, T.J. (1992) Transactivation and transformation by Myb are negatively regulated by a leucine-zipper structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 3088-92.
- Kanei-Ishii, C., Sarai, A., Sawazaki, T., Nakagoshi, H., He, D.N., Ogata, K., Nishimura, Y. and Ishii, S. (1990) The tryptophan cluster: a hypothetical structure of the DNA-binding domain of the myb protooncogene product. *J Biol Chem*, **265**, 19990-5.
- Kaspar, P., Dvorakova, M., Kralova, J., Pajer, P., Kozmik, Z. and Dvorak, M. (1999) Myb-interacting protein, ATBF1, represses transcriptional activity of Myb oncoprotein. *J Biol Chem*, **274**, 14422-8.
- Katzen, A.L., Kornberg, T.B. and Bishop, J.M. (1985) Isolation of the proto-oncogene c-myb from *D. melanogaster*. *Cell*, **41**, 449-56.
- Kaufmann, U., Zuppinger, C., Waibler, Z., Rudiger, M., Urbich, C., Martin, B., Jockusch, B.M., Eppenberger, H. and Starzinski-Powitz, A. (2000) The armadillo repeat region targets ARVCF to cadherin-based cellular junctions. *J Cell Sci*, **113**, 4121-35.
- Kiewitz, A. and Wolfes, H. (1997) Mapping of protein-protein interactions between c-myb and its coactivator CBP by a new phage display technique. *FEBS Lett*, **415**, 258-62.
- Kirik, V. and Baumlein, H. (1996) A novel leaf-specific myb-related protein with a single binding repeat. *Gene*, **183**, 109-13.
- Klempnauer, K.H., Ramsay, G., Bishop, J.M., Moscovici, M.G., Moscovici, C., McGrath, J.P. and Levinson, A.D. (1983) The product of the retroviral transforming gene v-myb is a truncated version of the protein encoded by the cellular oncogene c-myb. *Cell*, **33**, 345-55.

- Krebs, A., Rothkegel, M., Klar, M. and Jockusch, B.M. (2001) Characterization of functional domains of mDia1, a link between the small GTPase Rho and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*, **114**, 3663-72.
- Kwiatkowski, D.J. and Bruns, G.A. (1988) Human profilin. Molecular cloning, sequence comparison, and chromosomal analysis. *J Biol Chem*, **263**, 5910-5.
- Kwiatkowski, D.J., Aklog, L., Ledbetter, D.H. and Morton, C.C. (1990) Identification of the functional profilin gene, its localization to chromosome subband 17p13.3, and demonstration of its deletion in some patients with Miller-Dieker syndrome. *Am J Hum Genet*, **46**, 559-67.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Lambrechts, A., Braun, A., Jonckheere, V., Aszodi, A., Lanier, L.M., Robbins, J., Van Colen, I., Vandekerckhove, J., Fassler, R. and Ampe, C. (2000) Profilin II is alternatively spliced, resulting in profilin isoforms that are differentially expressed and have distinct biochemical properties. *Mol Cell Biol*, **20**, 8209-19.
- Lambrechts, A., van Damme, J., Goethals, M., Vandekerckhove, J. and Ampe, C. (1995) Purification and characterization of bovine profilin II. Actin, poly(L- proline) and inositolphospholipid binding. *Eur J Biochem*, **230**, 281-6.
- Lambrechts, A., Verschelde, J.L., Jonckheere, V., Goethals, M., Vandekerckhove, J. and Ampe, C. (1997) The mammalian profilin isoforms display complementary affinities for PIP2 and proline-rich sequences. *Embo J*, **16**, 484-94.
- Lane, S., Farlie, P. and Watson, R. (1997) B-Myb function can be markedly enhanced by cyclin A-dependent kinase and protein truncation. *Oncogene*, **14**, 2445-53.
- Lassing, I. and Lindberg, U. (1985) Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature*, **314**, 472-4.
- Lassing, I. and Lindberg, U. (1988) Specificity of the interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and the profilin:actin complex. *J Cell Biochem*, **37**, 255-67.
- Laux, T., Fukami, K., Thelen, M., Golub, T., Frey, D. and Caroni, P. (2000) GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *J Cell Biol*, **149**, 1455-72.
- Lawrence, J.B. and Singer, R.H. (1986) Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal proteins. *Cell*, **45**, 407-15.

- Levenson, J.D., Koskinen, P.J., Orrico, F.C., Rainio, E.M., Jalkanen, K.J., Dash, A.B., Eisenman, R.N. and Ness, S.A. (1998) Pim-1 kinase and p100 cooperate to enhance c-Myb activity. *Mol Cell*, **2**, 417-25.
- Lin, H.H., Sternfeld, D.C., Shimpock, S.G., Popp, R.A. and Mucenski, M.L. (1996) Functional analysis of the c-myb proto-oncogene. *Curr Top Microbiol Immunol*, **211**, 79-87.
- Low, T.L., Hu, S.K. and Goldstein, A.L. (1981) Complete amino acid sequence of bovine thymosin beta 4: a thymic hormone that induces terminal deoxynucleotidyl transferase activity in thymocyte populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 1162-1166.
- Lu, J. and Pollard, T.D. (2001) Profilin binding to poly-L-proline and actin monomers along with ability to catalyze actin nucleotide exchange is required for viability of fission yeast. *Mol Biol Cell*, **12**, 1161-75.
- Lugert, T. and Werr, W. (1994) A novel DNA-binding domain in the Shrunk initiator-binding protein (IBP1). *Plant Mol Biol*, **25**, 493-506.
- Luscher, B., Christenson, E., Litchfield, D.W., Krebs, E.G. and Eisenman, R.N. (1990) Myb DNA binding inhibited by phosphorylation at a site deleted during oncogenic activation. *Nature*, **344**, 517-22.
- Machesky, L.M. and Pollard, T.D. (1993) Profilin as a potential mediator of membrane-cytoskeleton communication. *Trends Cell Biol.*, **3**, 381-385.
- Machesky, L.M., Cole, N.B., Moss, B. and Pollard, T.D. (1994) Vaccinia virus expresses a novel profilin with a higher affinity for polyphosphoinositides than actin. *Biochemistry*, **33**, 10815-24.
- Machesky, L.M., Goldschmidt-Clermont, P.J. and Pollard, T.D. (1990) The affinities of human platelet and Acanthamoeba profilin isoforms for polyphosphoinositides account for their relative abilities to inhibit phospholipase C. *Cell Regul*, **1**, 937-50.
- Mahoney, N.M., Janmey, P.A. and Almo, S.C. (1997) Structure of the profilin-poly-L-proline complex involved in morphogenesis and cytoskeletal regulation. *Nat Struct Biol*, **4**, 953-60.
- Mammoto, A., Sasaki, T., Asakura, T., Hotta, I., Imamura, H., Takahashi, K., Matsuura, Y., Shirao, T. and Takai, Y. (1998) Interactions of drebrin and gephyrin with profilin. *Biochem Biophys Res Commun*, **243**, 86-9.
- Manseau, L., Calley, J. and Phan, H. (1996) Profilin is required for posterior patterning of the Drosophila oocyte. *Development*, **122**, 2109-16.

- Marocco, A., Wissenbach, M., Becker, D., Paz-Ares, J., Saedler, H., Salamini, F. and Rohde, W. (1989) Multiple genes are transcribed in *Hordeum vulgare* and *Zea mays* that carry the DNA binding domain of the myb oncoproteins. *Mol Gen Genet*, **216**, 183-7.
- Marquardt, K. (1998) p42POP, ein neues, Profilin-bindendes Protein: Identifizierung und Charakterisierung des Kernfragmentes p42 Δ POP1. Dissertation, TU Braunschweig
- Mayboroda, O., Schluter, K. and Jockusch, B.M. (1997) Differential colocalization of profilin with microfilaments in PtK2 cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, **37**, 166-77.
- Mazumder, B. and Barik, S. (1994) Requirement of casein kinase II-mediated phosphorylation for the transcriptional activity of human respiratory syncytial viral phosphoprotein P: transdominant negative phenotype of phosphorylation- defective P mutants. *Virology*, **205**, 104-11.
- Melotti, P., Ku, D.H. and Calabretta, B. (1994) Regulation of the expression of the hematopoietic stem cell antigen CD34: role of c-myb. *J Exp Med*, **179**, 1023-8.
- Mettus, R.V., Litvin, J., Wali, A., Toscani, A., Latham, K., Hatton, K. and Reddy, E.P. (1994) Murine A-myb: evidence for differential splicing and tissue-specific expression. *Oncogene*, **9**, 3077-86.
- Metzler, W.J., Bell, A.J., Ernst, E., Lavoie, T.B. and Mueller, L. (1994) Identification of the poly-L-proline-binding site on human profilin. *J Biol Chem*, **269**, 4620-5.
- Michael, W.M., Choi, M. and Dreyfuss, G. (1995) A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature- dependent nuclear protein export pathway. *Cell*, **83**, 415-22.
- Migliarese, M.R., Richardson, A.F., Aziz, N. and Bender, T.P. (1996) Differential regulation of c-Myb-induced transcription activation by a phosphorylation site in the negative regulatory domain. *J Biol Chem*, **271**, 22697-705.
- Miki, H., Suetsugu, S. and Takenawa, T. (1998) WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *Embo J*, **17**, 6932-41.
- Miller, C.A., 3rd, Cohen, M.D. and Costa, M. (1991) Complexing of actin and other nuclear proteins to DNA by cis- diamminedichloroplatinum(II) and chromium compounds. *Carcinogenesis*, **12**, 269-76.
- Mink, S., Kerber, U. and Klempnauer, K.H. (1996) Interaction of C/EBP β and v-Myb is required for synergistic activation of the mim-1 gene. *Mol Cell Biol*, **16**, 1316-25.

- Mucenski, M.L., McLain, K., Kier, A.B., Swerdlow, S.H., Schreiner, C.M., Miller, T.A., Pietryga, D.W., Scott, W.J. and Potter, S.S. (1991) A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell*, **65**, 677-89.
- Myat, M.M., Anderson, S., Allen, L.A. and Aderem, A. (1997) MARCKS regulates membrane ruffling and cell spreading. *Curr Biol*, **7**, 611-4.
- Nakagoshi, H., Kanei-Ishii, C., Sawazaki, T., Mizuguchi, G. and Ishii, S. (1992) Transcriptional activation of the c-myc gene by the c-myb and B-myb gene products. *Oncogene*, **7**, 1233-40.
- Nakayama, K., Yamamoto, R., Ishii, S. and Nakauchi, H. (1993) Binding of c-Myb to the core sequence of the CD4 promoter. *Int Immunol*, **5**, 817-24.
- Nakayasu, H. and Ueda, K. (1983) Association of actin with the nuclear matrix from bovine lymphocytes. *Exp Cell Res*, **143**, 55-62.
- Ness, S.A., Beug, H. and Graf, T. (1987) v-myb dominance over v-myc in doubly transformed chick myelomonocytic cells. *Cell*, **51**, 41-50.
- Ness, S.A., Kowenz-Leutz, E., Casini, T., Graf, T. and Leutz, A. (1993) Myb and NF-M: combinatorial activators of myeloid genes in heterologous cell types. *Genes Dev*, **7**, 749-59.
- Ness, S.A., Marknell, A. and Graf, T. (1989) The v-myb oncogene product binds to and activates the promyelocyte-specific mim-1 gene. *Cell*, **59**, 1115-25.
- Nicolaidis, N.C., Gualdi, R., Casadevall, C., Manzella, L. and Calabretta, B. (1991) Positive autoregulation of c-myb expression via Myb binding sites in the 5' flanking region of the human c-myb gene. *Mol Cell Biol*, **11**, 6166-76.
- Nishida, E., Iida, K., Yonezawa, N., Koyasu, S., Yahara, I. and Sakai, H. (1987) Cofilin is a component of intranuclear and cytoplasmic actin rods induced in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 5262-6.
- Nishida, E., Maekawa, S. and Sakai, H. (1984) Characterization of the action of porcine brain profilin on actin polymerization. *J Biochem (Tokyo)*, **95**, 399-404.
- Nix, D.A. and Beckerle, M.C. (1997) Nuclear-cytoplasmic shuttling of the focal contact protein, zyxin: a potential mechanism for communication between sites of cell adhesion and the nucleus. *J Cell Biol*, **138**, 1139-47.
- Nix, D.A., Fradelizi, J., Bockholt, S., Menichi, B., Louvard, D., Friederich, E. and Beckerle, M.C. (2001) Targeting of zyxin to sites of actin membrane interaction and to the nucleus. *J Biol Chem*, **276**, 34759-67.

- Nodelman, I.M., Bowman, G.D., Lindberg, U. and Schutt, C.E. (1999) X-ray structure determination of human profilin II: A comparative structural analysis of human profilins. *J Mol Biol*, **294**, 1271-85.
- Nomura, N., Takahashi, M., Matsui, M., Ishii, S., Date, T., Sasamoto, S. and Ishizaki, R. (1988) Isolation of human cDNA clones of myb-related genes, A-myb and B-myb. *Nucleic Acids Res*, **16**, 11075-89.
- Nomura, T., Sakai, N., Sarai, A., Sudo, T., Kanei-Ishii, C., Ramsay, R.G., Favier, D., Gonda, T.J. and Ishii, S. (1993) Negative autoregulation of c-Myb activity by homodimer formation through the leucine zipper. *J Biol Chem*, **268**, 21914-23.
- Oelgeschlager, M., Janknecht, R., Krieg, J., Schreek, S. and Luscher, B. (1996a) Interaction of the co-activator CBP with Myb proteins: effects on Myb- specific transactivation and on the cooperativity with NF-M. *Embo J*, **15**, 2771-80.
- Oelgeschlager, M., Nuchprayoon, I., Luscher, B. and Friedman, A.D. (1996b) C/EBP, c-Myb, and PU.1 cooperate to regulate the neutrophil elastase promoter. *Mol Cell Biol*, **16**, 4717-25.
- Ogata, K., Hojo, H., Aimoto, S., Nakai, T., Nakamura, H., Sarai, A., Ishii, S. and Nishimura, Y. (1992) Solution structure of a DNA-binding unit of Myb: a helix-turn-helix- related motif with conserved tryptophans forming a hydrophobic core. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 6428-32.
- Ogata, K., Morikawa, S., Nakamura, H., Sekikawa, A., Inoue, T., Kanai, H., Sarai, A., Ishii, S. and Nishimura, Y. (1994) Solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices. *Cell*, **79**, 639-48.
- Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H. and Nakatani, Y. (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, **87**, 953-9.
- Oh, I.H. and Reddy, E.P. (1997) Murine A-myb gene encodes a transcription factor, which cooperates with Ets-2 and exhibits distinctive biochemical and biological activities from c-myb. *J Biol Chem*, **272**, 21432-43.
- Oh, I.H. and Reddy, E.P. (1998) The C-terminal domain of B-Myb acts as a positive regulator of transcription and modulates its biological functions. *Mol Cell Biol*, **18**, 499-511.
- Oh, I.H. and Reddy, E.P. (1999) The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene*, **18**, 3017-33.

- Ording, E., Kvavik, W., Bostad, A. and Gabrielsen, O.S. (1994) Two functionally distinct half sites in the DNA-recognition sequence of the Myb oncoprotein. *Eur J Biochem*, **222**, 113-20.
- Pantaloni, D. and Carlier, M.F. (1993) How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell*, **75**, 1007-1014.
- Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P.A. and Saedler, H. (1987) The regulatory c1 locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *Embo J*, **6**, 3553-8.
- Petit, M.M., Fradelizi, J., Golsteyn, R.M., Ayoubi, T.A., Menichi, B., Louvard, D., Van de Ven, W.J. and Friederich, E. (2000) LPP, an actin cytoskeleton protein related to zyxin, harbors a nuclear export signal and transcriptional activation capacity. *Mol Biol Cell*, **11**, 117-29.
- Petit, M.M., Mols, R., Schoenmakers, E.F., Mandahl, N. and Van de Ven, W.J. (1996) LPP, the preferred fusion partner gene of HMGIC in lipomas, is a novel member of the LIM protein gene family. *Genomics*, **36**, 118-29.
- Petrella, E.C., Machesky, L.M., Kaiser, D.A. and Pollard, T.D. (1996) Structural requirements and thermodynamics of the interaction of proline peptides with profilin. *Biochemistry*, **35**, 16535-43.
- Pfitzner, E., Kirfel, J., Becker, P., Rolke, A. and Schule, R. (1998) Physical interaction between retinoic acid receptor and the oncoprotein myb inhibits retinoic acid-dependent transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5539-44.
- Pollard, T.D. and Cooper, J.A. (1984) Quantitative analysis of the effect of *Acanthamoeba* profilin on actin filament nucleation and elongation. *Biochemistry*, **23**, 6631-41.
- Ptashne, M. (1988) How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature*, **335**, 683-9.
- Raghunathan, V., Mowery, P., Rozycki, M., Lindberg, U. and Schutt, C. (1992) Structural changes in profilin accompany its binding to phosphatidylinositol, 4,5-bisphosphate. *FEBS Lett*, **297**, 46-50.
- Reed, J.C., Nowell, P.C. and Hoover, R.G. (1985) Regulation of c-myc mRNA levels in normal human lymphocytes by modulators of cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 4221-4.

- Reinhard, M., Giehl, K., Abel, K., Haffner, C., Jarchau, T., Hoppe, V., Jockusch, B.M. and Walter, U. (1995) The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *Embo J*, **14**, 1583-9.
- Rosette, C. and Karin, M. (1995) Cytoskeletal control of gene expression: depolymerization of microtubules activates NF-kappa B. *J Cell Biol*, **128**, 1111-9.
- Rosinski, J.A. and Atchley, W.R. (1998) Molecular evolution of the Myb family of transcription factors: evidence for polyphyletic origin. *J Mol Evol*, **46**, 74-83.
- Rosson, D., Dugan, D. and Reddy, E.P. (1987) Aberrant splicing events that are induced by proviral integration: implications for myb oncogene activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 3171-5.
- Rudiger, M., Jockusch, B.M. and Rothkegel, M. (1997) Epitope tag-antibody combination useful for the detection of protein expression in prokaryotic and eukaryotic cells. *Biotechniques*, **23**, 96-7.
- Safer, D., Elzinga, M. and Nachmias, V.T. (1991) Thymosin beta 4 and Fx, an actin-sequestering peptide, are indistinguishable. *J Biol Chem*, **266**, 4029-4032.
- Saikumar, P., Murali, R. and Reddy, E.P. (1990) Role of tryptophan repeats and flanking amino acids in Myb-DNA interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 8452-6.
- Sakura, H., Kanei-Ishii, C., Nagase, T., Nakagoshi, H., Gonda, T.J. and Ishii, S. (1989) Delineation of three functional domains of the transcriptional activator encoded by the c-myb protooncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 5758-62.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA-sequencing with chain terminator inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-67.
- Sano, Y. and Ishii, S. (2001) Increased affinity of c-Myb for CREB-binding protein (CBP) after CBP- induced acetylation. *J Biol Chem*, **276**, 3674-82.
- Scheer, U., Hinssen, H., Franke, W.W. and Jockusch, B.M. (1984) Microinjection of actin-binding proteins and actin antibodies demonstrates involvement of nuclear actin in transcription of lampbrush chromosomes. *Cell*, **39**, 111-22.
- Schluter, K., Jockusch, B.M. and Rothkegel, M. (1997) Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochim Biophys Acta*, **1359**, 97-109.
- Schluter, K., Schleicher, M. and Jockusch, B.M. (1998) Effects of single amino acid substitutions in the actin-binding site on the biological activity of bovine profilin I. *J Cell Sci*, **111**, 3261-73.

- Schutt, C.E., Myslik, J.C., Rozycki, M.D., Goonesekere, N.C. and Lindberg, U. (1993) The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature*, **365**, 810-6.
- Schwienbacher, C., Jockusch, B.M. and Rudiger, M. (1996) Intramolecular interactions regulate serine/threonine phosphorylation of vinculin. *FEBS Lett*, **384**, 71-4.
- Sheiness, D. and Gardinier, M. (1984) Expression of a proto-oncogene (proto-myb) in hemopoietic tissues of mice. *Mol Cell Biol*, **4**, 1206-12.
- Shen-Ong, G.L. (1987) Alternative internal splicing in c-myb RNAs occurs commonly in normal and tumor cells. *Embo J*, **6**, 4035-9.
- Shen-Ong, G.L., Luscher, B. and Eisenman, R.N. (1989) A second c-myb protein is translated from an alternatively spliced mRNA expressed from normal and 5'-disrupted myb loci. *Mol Cell Biol*, **9**, 5456-63.
- Singh, S.S., Chauhan, A., Murakami, N., Styles, J., Elzinga, M. and Chauhan, V.P. (1996) Phosphoinositide-dependent in vitro phosphorylation of profilin by protein kinase C. Phospholipid specificity and localization of the phosphorylation site. *Recept Signal Transduct*, **6**, 77-86.
- Siu, G., Wurster, A.L., Lipsick, J.S. and Hedrick, S.M. (1992) Expression of the CD4 gene requires a Myb transcription factor. *Mol Cell Biol*, **12**, 1592-604.
- Smith, S.S., Kelly, K.H. and Jockusch, B.M. (1979) Actin co-purifies with RNA polymerase II. *Biochem Biophys Res Commun*, **86**, 161-6.
- Sohn, R.H. and Goldschmidt-Clermont, P.J. (1994) Profilin: at the crossroads of signal transduction and the actin cytoskeleton. *Bioessays*, **16**, 465-72.
- Sohn, R.H., Chen, J., Koblan, K.S., Bray, P.F. and Goldschmidt-Clermont, P.J. (1995) Localization of a binding site for phosphatidylinositol 4,5- bisphosphate on human profilin. *J Biol Chem*, **270**, 21114-20.
- Sotiropoulos, A., Gineitis, D., Copeland, J. and Treisman, R. (1999) Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell*, **98**, 159-69.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**, 503-17.
- Stober-Grasser, U., Brydolf, B., Bin, X., Grasser, F., Firtel, R.A. and Lipsick, J.S. (1992) The Myb DNA-binding domain is highly conserved in Dictyostelium discoideum. *Oncogene*, **7**, 589-96.

- Stossel, T.P., Condeelis, J., Cooley, L., Hartwig, J.H., Noegel, A., Schleicher, M. and Shapiro, S.S. (2001) Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 138-45.
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, **189**, 113-30.
- Suetsugu, S., Miki, H. and Takenawa, T. (1998) The essential role of profilin in the assembly of actin for microspike formation. *Embo J*, **17**, 6516-26.
- Sun, H.Q., Kwiatkowska, K. and Yin, H.L. (1995) Actin monomer binding proteins. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 102-10.
- Sundell, C.L. and Singer, R.H. (1991) Requirement of microfilaments in sorting of actin messenger RNA. *Science*, **253**, 1275-7.
- Takahashi, T., Nakagoshi, H., Sarai, A., Nomura, N., Yamamoto, T. and Ishii, S. (1995) Human A-myb gene encodes a transcriptional activator containing the negative regulatory domains. *FEBS Lett*, **358**, 89-96.
- Tanaka, M. and Shibata, H. (1985) Poly(L-proline)-binding proteins from chick embryos are a profilin and a profilactin. *Eur J Biochem*, **151**, 291-7.
- Tavner, F.J., Simpson, R., Tashiro, S., Favier, D., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Macmillan, E.M., Lutwyche, J., Keough, R.A., Ishii, S. and Gonda, T.J. (1998) Molecular cloning reveals that the p160 Myb-binding protein is a novel, predominantly nucleolar protein which may play a role in transactivation by Myb. *Mol Cell Biol*, **18**, 989-1002.
- Thorn, K.S., Christensen, H.E., Shigeta, R., Huddler, D., Shalaby, L., Lindberg, U., Chua, N.H. and Schutt, C.E. (1997) The crystal structure of a major allergen from plants. *Structure*, **5**, 19-32.
- Tice-Baldwin, K., Fink, G.R. and Arndt, K.T. (1989) BAS1 has a Myb motif and activates HIS4 transcription only in combination with BAS2. *Science*, **246**, 931-5.
- Tomita, A., Towatari, M., Tsuzuki, S., Hayakawa, F., Kosugi, H., Tamai, K., Miyazaki, T., Kinoshita, T. and Saito, H. (2000) c-Myb acetylation at the carboxyl-terminal conserved domain by transcriptional co-activator p300. *Oncogene*, **19**, 444-51.
- Toscani, A., Mettus, R.V., Coupland, R., Simpkins, H., Litvin, J., Orth, J., Hatton, K.S. and Reddy, E.P. (1997) Arrest of spermatogenesis and defective breast development in mice lacking A-myb. *Nature*, **386**, 713-7.

- Trauth, K., Mutschler, B., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G. and Klempnauer, K.H. (1994) Mouse A-myb encodes a trans-activator and is expressed in mitotically active cells of the developing central nervous system, adult testis and B lymphocytes. *Embo J*, **13**, 5994-6005.
- Turner, C.E., Pavalko, F.M. and Burridge, K. (1989) The role of phosphorylation and limited proteolytic cleavage of talin and vinculin in the disruption of focal adhesion integrity. *J Biol Chem*, **264**, 11938-44.
- Van Troys, M., Dewitte, D., Goethals, M., Carlier, M.F., Vandekerckhove, J. and Ampe, C. (1996) The actin binding site of thymosin beta 4 mapped by mutational analysis. *Embo J*, **15**, 201-10.
- Vemuri, B. and Singh, S.S. (2001) Protein kinase C isozyme-specific phosphorylation of profilin. *Cell Signal*, **13**, 433-9.
- Verheyen, E.M. and Cooley, L. (1994) Profilin mutations disrupt multiple actin-dependent processes during Drosophila development. *Development*, **120**, 717-28.
- Villarejo, M.R. and Zabin, I. (1974) Beta-galactosidase from termination and deletion mutant strains. *J Bacteriol*, **120**, 466-74.
- Vinson, V.K., Archer, S.J., Lattman, E.E., Pollard, T.D. and Torchia, D.A. (1993) Three-dimensional solution structure of Acanthamoeba profilin-I. *J Cell Biol*, **122**, 1277-83.
- Vuori, K. and Ruoslahti, E. (1993) Activation of protein kinase C precedes alpha 5 beta 1 integrin-mediated cell spreading on fibronectin. *J Biol Chem*, **268**, 21459-62.
- Walders-Harbeck, B., Khaitlina, S.Y., Hinssen, H., Jockusch, B.M. and Illenberger S. (2002) The vasodilator-stimulated phosphoprotein promotes actin polymerisation through direct binding to monomeric actin. *FEBS Lett*, under revision.
- Walen (1961). *Genetics* **51**, 915.
- Walen and Braun (1965). *Nature* **194**, 406
- Wang, X., Kibschull, M., Laue, M.M., Lichte, B., Petrasch-Parwez, E. and Kilimann, M.W. (1999) Aczonin, a 550-kD putative scaffolding protein of presynaptic active zones, shares homology regions with Rim and Bassoon and binds profilin. *J Cell Biol*, **147**, 151-62.
- Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B.M. and Narumiya, S. (1997) p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *Embo J*, **16**, 3044-56.

- Weaver, R.F. (1976) Structural comparison of deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerases I and II from the slime mold *Physarum polycephalum*. *Arch Biochem Biophys*, **172**, 470-5.
- Weekes, J., Barry, S.T. and Critchley, D.R. (1996) Acidic phospholipids inhibit the intramolecular association between the N- and C-terminal regions of vinculin, exposing actin-binding and protein kinase C phosphorylation sites. *Biochem J*, **314**, 827-32.
- Westin, E.H., Gallo, R.C., Arya, S.K., Eva, A., Souza, L.M., Baluda, M.A., Aaronson, S.A. and Wong-Staal, F. (1982) Differential expression of the amv gene in human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 2194-8.
- Wiedemann, P., Giehl, K., Almo, S.C., Fedorov, A.A., Girvin, M., Steinberger, P., Rudiger, M., Ortner, M., Sippl, M., Dolecek, C., Kraft, D., Jockusch, B. and Valenta, R. (1996) Molecular and structural analysis of a continuous birch profilin epitope defined by a monoclonal antibody. *J Biol Chem*, **271**, 29915-21.
- Wilhelm, J.E. and Vale, R.D. (1993) RNA on the move: the mRNA localization pathway. *J Cell Biol*, **123**, 269-74.
- Witke, W., Podtelejnikov, A.V., Di Nardo, A., Sutherland, J.D., Gurniak, C.B., Dotti, C. and Mann, M. (1998) In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly. *Embo J*, **17**, 967-76.
- Witke, W., Sutherland, J.D., Sharpe, A., Arai, M. and Kwiatkowski, D.J. (2001) Profilin I is essential for cell survival and cell division in early mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3832-6.
- Woo, C.H., Sopchak, L. and Lipsick, J.S. (1998) Overexpression of an alternatively spliced form of c-Myb results in increases in transactivation and transforms avian myelomonoblasts. *J Virol*, **72**, 6813-21.
- Woods, A. and Couchman, J.R. (1992) Protein kinase C involvement in focal adhesion formation. *J Cell Sci*, **101**, 277-90.
- Yaffe, D. and Saxel, O. (1977) Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, **270**, 725-7.
- Ziebold, U., Bartsch, O., Marais, R., Ferrari, S. and Klempnauer, K.H. (1997) Phosphorylation and activation of B-Myb by cyclin A-Cdk2. *Curr Biol*, **7**, 253-60.

- Zhao, M.K., Wang, Y., Murphy, K., Yi, J., Beckerle, M.C. and Gilmore, T.D. (1999) LIM domain-containing protein trip6 can act as a coactivator for the v-Rel transcription factor. *Gene Expr*, **8**, 207-17.
- Zhao, W.M., Jiang, C., Kroll, T.T. and Huber, P.W. (2001) A proline-rich protein binds to the localization element of *Xenopus* Vg1 mRNA and to ligands involved in actin polymerization. *Embo J*, **20**, 2315-25.
- Ziegler, W.H., Tigges, U., Zieseniss, A. and Jockusch, B.M. (2002) A lipid-regulated docking site on vinculin for protein kinase C. *J Biol Chem*, **277**, 7396-404.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, recht herzlich bedanken.

Frau Prof. Brigitte M. Jockusch danke ich sehr für ihre fachliche und persönliche Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit. Die optimalen Arbeitsbedingungen in ihrer Arbeitsgruppe und der wissenschaftliche Gestaltungsfreiraum, den sie ihren Mitarbeitern einräumt, haben zudem zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Prof. H.-H. Arnold möchte ich mich für die Übernahme des Koreferats und bei Prof. J. Wehland für die Teilnahme an der Prüfungskommission bedanken.

Dr. Martin Rothkegel möchte ich nicht nur für seine stete Diskussionsbereitschaft, wissenschaftlichen Ratschläge und die Zusammenarbeit in den letzten Jahren, sondern auch für Hilfestellungen bei vielen Laborproblemen und bei der Fertigstellung dieser Arbeit danken.

Bei Dr. Barbara Winter möchte ich mich für zahlreiche Tipps, kritische Anmerkungen und den ein oder anderen „Tritt“ bedanken.

Mein Dank gilt auch Dr. Susanne Illenberger und Dr. Wolfgang Ziegler für fachliche Ratschläge und Ilona Demesvary für die Entlastung und Hilfe bei verwaltungstechnischen Problemen.

Allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe möchte ich nicht nur für ihre Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit danken, sondern auch für die gute Atmosphäre, in der nicht nur das Arbeiten angenehm war. Meinen Laborkollegen aus dem „Schweinelabor“ sei in diesem Zusammenhang auch für die gegenseitige Unterstützung und die Toleranz meines Ordnungssinnes gedankt. Besonders möchte ich meinem Freund und Exkollegen Stefan Hüttelmaier für die gemeinsame, kreative Zeit im Labor und außerhalb danken. Ebenso möchte ich mich bei Torben Lübke, Lisa Blumenthal, Berenike Kleinhenz, Ulrich Tigges, Kathrin Schloen, Torsten Giesemann und Tania Messerschmidt für ihre fachliche Unterstützung, den netten Laboralltag und gesellige Abende danken.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinen Eltern, meinen Schwestern Katinka und Barbara, sowie meiner Freundin Dagmar, die durch ihre Unterstützung, ihren Rückhalt und ihr Verständnis entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.